Analyse der Gen-Region für Stickstoff-Fixierung (nif-Region) aus Rhizobium meliloti

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Birgit Jäckel
aus
Weiden

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0024

Analyse der Gen-Region für Stickstoff-Fixierung (nif-Region) aus Rhizobium meliloti

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von

Birgit Jäckel
aus
Weiden

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV. LEIDEN BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.9.1981

Vorsitzender der Promotionskommission:
Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter: Professor Dr. A. Pühler

Zweitberichterstatter: Professor Dr. W. Heumann

Inhaltsverzeichnis: Seite

A. Zusammenfassung 4
B. Einleitung 6
C. Material und Methoden 8
1. Bakterienstämme 8
2. Medien 9
2.1 Nährmedien 9
2.2 Enzyme, Chemikalien, Filterpapiere 10
2.3 Lösungen und Puffer 12
2.3.1 DNA-Isolierung 12
2.3.2 Gel-Elektrophorese und Restriktionsanalyse 13
2.3.3 Nick-Translation 13
2.3.4 Southern-Transfer 13
2.3.5 Hybridisierung 14
3. DNA-Isolierung 15
3.1 Isolierung chromosomaler und Gesamt-DNA nach W.Müller 15
3.2 Sarkosyl-Lyse 16
3.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von "cleared lysates" 17
3.4 Isolierung von Plasmid-DNA nach Hansen & Olsen 18
3.5 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation 19
3.6 Aufbereitung der DNA aus CsCl-EtBr-Dichtegradienten 19
3.7 Konzentrationsbestimmung 20
4. Restriktionsanalyse der isolierten DNA 21
4.1 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen 21
4.2 Gel-Elektrophorese 21
4.3 Längenbestimmung der DNA-Fragmente 22
5. DNA-DNA-Hybridisierung 24
5.1 Radioaktive Markierung von DNA durch "Nick-Translation" 24
5.2 Southern-Technik 25
5.2.1 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter 26
5.2.2 Hybridisierung 28
5.2.3 Autoradiographie 29
6. Nodulierung von Luzerne 30
6.1 Pflanzenanzucht und Infizierung mit Bakterien 30
6.2 Reisolierung von Bakterien aus Wurzelknöllchen 30

Seite

D. Ergebnisse 31

1. DNA-Isolierung 31

1.1 Gesamt-DNA 31

1.2 Rhizobien-Plasmide 31

1.3 Hybrid-Plasmide mit Genen aus der nif-Region von Klebsiella pneumoniae und Rhizobium meliloti und ihre Vektor-Plasmide 31

2. Hybridisierung von Rhizobium meliloti-Gesamt-DNA mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA 35

2.1 Das Plasmid pWK27 35

2.2 Hybridisierungen von R.meliloti-DNA, verdaut mit den Restriktionsenzymen EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI 37

2.2.1 EcoRI- und XhoI-Verdauungen 37

2.2.2 HindIII-, EcoRI/HindIII- und XhoI/HindIII-Verdauungen 44

2.2.3 BamHI- und BamHI/XhoI-Verdauungen 45

2.2.4 EcoRI/BamHI- und HindIII/BamHI-Verdauungen 45

2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 57

3. Weitere Aufklärung der Restriktionsanalysen von R.meliloti-"nif-DNA" 59

3.1 Bedeutung der dünnen Banden bei Hybridisierung von EcoRI-verdauter R.meliloti-DNA mit pWK27-DNA 59

3.2 Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pRmR2-DNA 61

3.3 Suche nach kleinen DNA-Fragmenten von R.meliloti E12, die mit pWK27 hybridisieren 68

4. Aufstellung von Restriktionskarten der mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen hybridisierenden Region bei 15 verschiedenen Rhizobium meliloti-Wildtyp-Stämmen 71

4.1 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse 71

4.2 Restriktionskarten für die "nif-Region" der untersuchten R.meliloti-Stämme 73

5. Hybridisierungen mit klonierter nif-DNA aus K.pneumoniae und R.meliloti 76

5.1 Bestimmung des mit K.pneumoniae-Gesamt-DNA homologen DNA-Abschnitts der in pRmR2 klonierten R.meliloti-"nif-Region" 76

5.2 Bestimmung der mit R.meliloti-Gesamt-DNA homologen nif-Gene von K.pneumoniae 78

Seite

6. Suche nach "nif-Genen" in Rhizobium meliloti-Plasmid-DNA 81
6.1 Hybridisierung EcoRI-verdauter R.meliloti-Plasmid-DNA mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA 81
6.2 Wiederholung der Hybridisierung mit neu isolierter R.meliloti-Plasmid-DNA 83
6.3 Versuch, den Transposon-Charakter der nif-Region von R.meliloti nachzuweisen 84
6.3.1 Reinfektion von Luzerne zur Reisolierung gut Stickstoff-fixierender R.meliloti-Stämme 84
6.3.2 Hybridisierung von Plasmid- und Gesamt-DNA aus reisolierten R.meliloti-Stämmen mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA 85

E. Diskussion 87
1. Restriktionsanalyse von R.meliloti-DNA 87
2. Hybridisierung von R.meliloti-Gesamt-DNA mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen 88
3. Restriktionskarten und Länge der zu den K.pneumoniae-nif-Genen homologen Region in R.meliloti 90
4. Lokalisierung der R.meliloti-nif-DNA 93
5. Abschließende Bemerkungen und Ausblick 96

F. Literatur 98

Anhang:
Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen 105

A. Zusammenfassung

Die Verwandtschaft der Gene für Stickstoff-Fixierung (nitrogen fixation, nif-Gene) von K.pneumoniae und R.meliloti wurde bei 15 verschiedenen R.meliloti-Wildtyp-Stämmen untersucht, die größtenteils aus Feldisolaten des Erlanger Raumes stammten. Alle enthielten mindestens e i n großes Plasmid (23).
Zum Nachweis homologer DNA-Bereiche wurde die Southern-Methode angewandt:
Mit Restriktionsendonukleasen verdaute DNA wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese in Fragmente aufgetrennt, vom Gel auf Nitrocellulose-Filter übertragen und mit ^{32}P-markierter DNA hybridisiert; entstandene Hybridfragmente wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.
Bei Hybridisierungen von R.meliloti-Gesamt-DNA mit dem Plasmid pWK27, in dem die Strukturgene für die K.pneumoniae-Nitrogenase kloniert vorliegen (47), konnten hybridisierende R.meliloti-Fragmente mit einem homologen Kernstück von etwa 2 kb entdeckt werden. Das Trägerplasmid pACYC184 von pWK27 zeigte keine Hybridisierung mit R.meliloti-DNA.
Die Restriktionskarte der R.meliloti-DNA-Region, die die homologen Sequenzen zu den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen enthält (R.meliloti-"nif-Region"), wurde für die Restriktionsenzyme EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI erstellt. Hybridisierungen mit pWK27-DNA sowie mit DNA von pRmR2, in dem ein mit der K.pneumoniae-nif-Region hybridisierendes 4 kb-Fragment aus R.meliloti 2011 kloniert ist (52), wurden durchgeführt. Bei der Erstellung der Restriktionskarten der untersuchten 15 R.meliloti-Stämme ergab sich eine Unterteilung in 3 Gruppen mit etwas unterschiedlicher Anordnung einiger Restriktionsschnitte in der "nif-Region".
Eine Hybridisierung zwischen pRmR2 und ^{32}P-markierter Gesamt-DNA von K.pneumoniae bestätigte den homologen Anteil der R.meliloti-"nif-Region".
Dagegen ergab eine Hybridisierung zwischen dem Plasmid pWK120, das die gesamte K.pneumoniae-nif-Region umfaßt (45, 46), und ^{32}P-markierter Gesamt-DNA von R.meliloti MVII/1, daß nicht nur die Nitrogenase-Strukturgene nif D und H, sondern noch weitere Gene von K.pneumoniae hybridisieren.
Bei Untersuchungen von R.meliloti-Plasmid-DNA wurden nur bei zwei

Stämmen zur K.pneumoniae-nif-Region homologe DNA-Fragmente gefunden. Sie hatten die gleiche Länge wie die hybridisierenden Fragmente entsprechend verdauter R.meliloti-Gesamt-DNA.

B. Einleitung

Bodenbakterien der Gattung Rhizobium binden in Symbiose mit Leguminosen Luftstickstoff ("N_2-Fixierung"). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Spezies Rhizobium meliloti führt die Stickstoffreduktion bei Melilotus albus (Steinklee) und Medicago sativa (Luzerne) durch. Dazu wird nach Infektion der Wurzelhaare durch die Bakterien die Bildung von Wurzelknöllchen in der Wirtspflanze induziert ("Nodulierung"). Dort werden die Bakterien in N_2-fixierende, aber nicht mehr teilungsfähige Bakteroide umgewandelt (2, 40).

Alle bisher untersuchten Rhizobien-Stämme enthalten Plasmide, die oft länger als 100 MD sind (12, 13, 20, 39, 40, 44, 55, 59). In 13 verschiedenen R.meliloti-Wildtyp-Stämmen aus Feldisolaten im Erlanger Raum sowie in je einem Stamm polnischen bzw. australischen Ursprungs wurde jeweils mindestens e i n Plasmid länger als 100 MD nachgewiesen (23).

Die Arbeitshypothese für eine extrachromosomale Existenz der genetischen Information für N_2-Fixierung wurde u.a. gestützt dadurch, daß Johnston et al. (25) bei Rhizobium leguminosarum ein Plasmid entdeckten, das die Fähigkeit übertrug, Erbsen zu nodulieren (nod-Gene), und häufig in Rhizobien-Mutanten mit defekter N_2-Fixierung die effektive Stickstoff-Bindung wieder herstellte. Nuti et al. (39) fanden außerdem Hybridisierung zwischen K.pneumoniae-nifKDH-DNA und Plasmiden aus R.leguminosarum und R.trifolii, so daß wenigstens einige Gene für effektive N_2-Fixierung (fix-Gene) auf Rhizobien-Plasmiden vermutet werden konnten.

Deshalb schienen dahingehende Untersuchungen auch bei R.meliloti sinnvoll, zumal zwar chromosomale Genkarten für einige R.meliloti-Stämme vorlagen (2, 11, 26, 27, 34), aber nichts über die Lokalisierung der nod- und fix-Gene bekannt war.

Da für die Hybridisierung von R.meliloti-Gesamt- und -Plasmid-DNA zunächst keine klonierten Rhizobium-nif-Gene vorlagen, wurde versucht, Sequenzhomologie mit der gut charakterisierten nif-Region von Klebsiella pneumoniae (7, 9, 31, 43, 47, 48, 50) nachzuweisen.

Die beiden Proteine des Nitrogenase-Enzym-Komplexes für N_2-Fixierung, das MoFe-Protein ("Nitrogenase") und das Fe-Protein ("Nitrogenase-Reduktase"), zeigen in allen bisher näher untersuchten Stickstoff bindenden Mikroorganismen große Ähnlichkeit (14, 18, 39),

und K.pneumoniae-nif-Gene liegen in Hybriden mit verschiedenen Plasmid- und Lambda-Phagen-Vektoren kloniert vor (45, 46, 47). Zur Hybridisierung wurden vor allem die Plasmide pWK27 mit den Strukturgenen der K.pneumoniae-Nitrogenase und pWK120 mit der gesamten Klebsiella-nif-Region ausgewählt (45, 46, 47). Als Rhizobium-Kontrollstamm diente R.leguminosarum 300, weil dort bereits Homologie mit der K.pneumoniae-nif-Region gefunden worden war (39).
In R.meliloti-Gesamt-DNA konnten DNA-Fragmente nachgewiesen werden, die mit den K.pneumoniae-nif-Genen in pWK27 hybridisierten. Es war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, für die Restriktionsenzyme EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI Restriktionskarten für den Teil des R.meliloti-Genoms aufzustellen, der mit den Klebsiella-nif-Strukturgenen hybridisiert. Die für 15 untersuchte Wildtyp-Stämme gefundenen Restriktionskarten sollten verglichen werden.
Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Restriktionsfragmente von pRmR2, einem Hybridplasmid mit R.meliloti-nif-DNA (52), mit ^{32}P-markierter K.pneumoniae-Gesamt-DNA sowie pWK27- und pWK120-Fragmente mit ^{32}P-markierter R.meliloti-Gesamt-DNA hybridisiert.
Hybridisierungen zwischen R.meliloti-Plasmid-DNA und pWK27 sollten zur Lösung des Problems, ob die R.meliloti-"nif-Region" auf dem Chromosom oder einem der Plasmide lokalisiert ist, beitragen.

C. Material und Methoden

1. Bakterienstämme

Gattung Rhizobium:

R.meliloti 20-1 (Stammsammlung Erlangen; erhalten als 2011 von Dénarié, Versailles, aber als RCR2011 ursprünglich aus Australien (12))

R.meliloti L5-30 (Kowalski, Polen (12))

R.meliloti MVII/1+) (Stammsammlung Erlangen)

R.meliloti E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 und E12 +) (Horn, Erlangen (23)).

R.leguminosarum 300 (Beringer, Norwich).

Klebsiella pneumoniae M5a1 (Mahl et al. (32)).

Verschiedene Escherichia coli-Stämme (vgl. Tab.1).

E.coli-Stamm	Plasmid	genetische Markierungen des Plasmides	Herkunft
HB101	pWL625	Ap^r, Km^r	Goebel, Würzburg
HB101	pWK1	Ap^r, nif Q - K(D)	Klipp, Bielefeld
HB101	pWK120	Ap^r, nif Q - J + weitere K.pneumoniae-Gene	Klipp, Bielefeld
C 600	pACYC184	Tc^r, Cm^r	Chang & Cohen, Stanford, California
HB101	pWK27	Tc^r, nif YKDH	Klipp, Bielefeld
HB101	pRmR2	Tc^r + 4 kb-Fragment aus der R.meliloti 2011-nif-Region	Ausubel, Cambridge (Massachusetts)

Tab.1: Escherichia coli-Stämme, die in einem Trägerplasmid Gene aus der nif-Region (nif Q - J) von K.pneumoniae M5a1 bzw. R.meliloti 2011 enthalten.
(Gene in Klammern liegen nur noch partiell auf dem betreffenden Plasmid).

+) Bei den Stämmen MVII/1 und E1 - E12 handelt es sich um Feldisolate aus dem Raum Erlangen, wobei R.meliloti MVII/1 und E12 aus Luzerne, E1 - E11 aus Steinklee gewonnen wurden.

2. Medien

2.1 Nährmedien

(Alle Angaben für 1 Liter Medium).

Nährmedien für Rhizobien-Stämme:

TY:

5 g Tryptone (Oxoid)
3 g Yeast Extract (Oxoid)
1,3 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$.

B + Y:

14 g Mannit (D(-)-Mannit, Merck)
10 µg Biotin (Merck)
3 g Yeast Extract (Oxoid)
1 ml Spurenelemente-Lösung
0,4 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
1 g KH_2PO_4
0,55 g KNO_3
0,55 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
1,3 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$.

Die Spurenelemente-Lösung enthält im Liter (aqua bidest.):
je 25 mg LiCl, KBr, KJ, $SnCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, Na_2MoO_4
je 50 mg $Al_2(SO_4)_3$, $NiSO_4$, $Co(NO_3)_2$, TiO_2
350 mg $MnCl_2$
500 mg H_3BO_3.

LL = Lab lemco:

8 g Lab Lemco (Ocoid).

RGMC:

8 g Tryptone (Oxoid)
1 g Yeast Extract (Oxoid)
10 g Mannit (D(-)-Mannit, Merck)
10 mg Biotin (Merck)
0,3 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
1 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$.

Nährmedien für Klebsiella pneumoniae und E.coli-Stämme:

PA:

17,5 g Antibiotic Medium No.3 (Assay Broth, Oxoid).

Antibiotika-Zusätze (für E.coli):

50 mg/l Ampicillin (Grünenthal, Stolberg im Rheinland)

10 mg/l Tetracyclin (= Reverin = Pyrrolidino-methyl-tetracyclin, Hoechst, Frankfurt)

Festmedien:

15 g Agar (Agar Nr.3, Oxoid) pro Liter Flüssigmedium.

Jensen-Nährlösung zur Anzucht von Luzerne-Pflänzchen (pro Liter aqua bidest.):

1 g $CaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$
0,2 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$
0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,2 g NaCl
0,1 g $FeCl_3$
1 ml Spurenelemente-Lösung.

2.2 Enzyme, Chemikalien, Filterpapiere

Restriktionsenzyme:

EcoRI und XhoI: Dr.Rösch, Elangen
HindIII und BamHI: Boehringer, Mannheim.

Sonstige Enzyme:

Lysozym aus Hühnereiweiß: } Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase I (Kornberg polymerase) grade I: } Boehringer, Mannheim

RNase = Ribonuklease aus Rinderpankreas: } Serva, Heidelberg
DNase I = Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas: } Serva, Heidelberg
Albumin aus Rinderserum: } Serva, Heidelberg
α-Amylase aus Aspergillus spec.: } Serva, Heidelberg

Proteinase K aus Pilzen: Merck, Darmstadt

Chemikalien (p.a.):

Merck, Darmstadt:

CsCl = Cäsiumchlorid
EDTA = Titriplex III
EtBr = Ethidiumbromid
iso-Butanol
Isopropanol = Propanol-(2)

Na-Pyrophosphat = tetra-Natrium-diphosphat-10-hydrat
Paraffin dünnflüssig
Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Serva, Heidelberg:
PEG = Polyäthylenglykol 6000 und 40 000
Sarkosyl = N-Lauroylsarkosin, Na-Salz
SDS = Dodecylsulfat, Na-Salz
Siliconlösung zum Silikonisieren von Glas
Silicon-Entschäumer
Triton X-100
Visking Dialyseschlauch

Sigma, St.Louis (USA):
dCTP = 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP = 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP = 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
Lachssperma-DNA, No. D-1626
PVP-360 = Polyvinylpyrrolidone Ø MW 360 000

Pharmacia, Uppsala (Schweden):
Ficoll 400 (MW 400 000)
Sephadex G-50, Medium grade

Amersham Buchler, Braunschweig:
^{32}P-α-dATP = Deoxyadenosine 5' -[α-^{32}P]-triphosphate,
Triethylammonium Salt, 2000-3000 Ci/mmol

Seakem, MCI Biochemicals, Rockland, Maine (USA):
Agarose HGT

Chemikalien ohne Angabe des Herstellers wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Filter:

Nitrocellulose- (=NC-) Filter:
S & S Membranfilter, 0,45 µm, 330 x 560 mm,
Schleicher & Schüll, Dassel

Whatman 3 MM -Filterpapier, 15 cm x 100 m,
Balston, England.

2.3 Lösungen und Puffer

2.3.1 DNA-Isolierung

TE = Tris-EDTA-Puffer:

1 mM EDTA
10 mM Tris-HCl, pH 7,5 oder pH 8

1 x SSC-Lösung:

0,15 M NaCl
0,015 M Na-Citrat (= tri-Natriumcitrat-2-hydrat)

CIA:

Chloroform/Isoamylalkohol (24 + 1)

TES-Puffer:

0,05 M Tris-HCl
0,005 M EDTA
0,05 M NaCl pH 8,0

Lysozym-Lösung für Sarkosyllyse:

10 mg Lysozym
4 ml 25 % Sucrose in TES (pH 8)
1 ml gekochte RNase-Lösung (5 mg/ml in TES, pH 8; 10 min gekocht und langsam abgekühlt)

Sarkosyl-Lösung:

10 ml 35 % N-Lauroylsarkosin-Lösung
25 ml 0,25 M EDTA, pH 8

Triton X-100-Lösung für "cleared lysates":

1 ml 10 % Triton X-100
12,5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,5
5 ml 1 M Tris, pH 8
80 ml H_2O

TE-Puffer nach Hansen & Olsen:

0,05 M Tris
0,02 M Na_2EDTA pH 8,0

Lysozym-Lösung für Hansen & Olsen-Lyse:

5 mg/ml Lysozym
0,1 mg/ml RNase (10 min gekocht und langsam abgekühlt) in TES, pH 8

PEG 6000-Lösung:

42 % Polyäthylenglykol in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7 (autoklaviert oder 15 min gekocht).

2.3.2 Gelelektrophorese und Restriktionsanalyse

Tris-Acetat-Puffer für Agarose-Gele:

40 mM Tris
10 mM Na-Acetat
1 mM EDTA
pH 7,8 (mit Eisessig einstellen)

Stoplösung für Verdauungen mit Restriktionsenzymen:

25 % Sucrose
2,5 M Harnstoff
250 mM EDTA, pH 8
5 % SDS
0,1 % Bromphenolblau

Verdünnungspuffer für Restriktionsenzyme:

10 mM K-PO_4, pH 7,4
7 mM 2-Mercapto-äthanol
50 % Glycerin

2.3.3 Nick-Translation

DNA-Polymerase-Puffer:

100 mM K-PO_4, pH 7,4
10 mM $MgCl_2$
20 mM 2-Mercapto-äthanol

2.3.4 Southern-Transfer

Denaturierungslösung:

0,2 N NaOH
0,6 M NaCl

Neutralisierungslösung:

1 M Tris/HCl
1,5 M NaCl pH 7,4

1 x SSC:

0,15 M NaCl
0,015 M Na-Citrat

2 x SSC enthält das Doppelte, 6 x SSC das 6-fache dieser Konzentrationen.

2.3.5 Hybridisierung

Denhardt-Lösung (16):

0,02 % Ficoll 400

0,02 % Polyvinylpyrrolidon

0,02 % Rinderserumalbumin

Diese Lösung wird in der 10-fachen und 100-fachen Konzentration steril angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

SET-Puffer:

30 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

150 mM NaCl pH 8,0

Von dieser Lösung werden 0,5- und 10-fache Ansätze verwendet.

SDS-Stammlösung: 10 %

Na-Pyrophosphat-Stammlösung: 10 %.

3. DNA-Isolierung

Bakterielle DNA wurde mit verschiedenen Lyse-Methoden gewonnen, je nachdem ob chromosomale bzw. Gesamt-DNA, kleine oder große Plasmide isoliert werden sollten.

3.1 Isolierung chromosomaler und Gesamt-DNA nach W.Müller

Ein Verfahren von W.Müller (36) diente zur Gewinnung weitgehend proteinfreier langmolekularer chromosomaler bzw. Gesamt-DNA aus Klebsiella pneumoniae und verschiedenen Rhizobium-Stämmen.
Die Angaben beziehen sich auf 2 - 2,5 g Bakterien (Naßgewicht) aus einer Übernachtkultur:

- Die Zellen durch niedertourige Zentrifugation ernten (4000 x g, 20 min: Beckman-Kühlzentrifuge) und in 1 x SSC (C.2.3.1) waschen
- abzentrifugieren (12 000 x g, 10 min, 5°C) und Bakterien-Feuchtgewicht bestimmen
- Sediment in 40 ml 1 x SSC resuspendieren
- 0,4 ml 0,5 M EDTA (pH 8) zugeben (Endkonzentration 1-5 mM EDTA)
- Bakteriensuspension auf 37°C erwärmen
- 0,5 ml Lysozym-Lösung (50 mg/ml) zufügen und 5 min bei 37°C inkubieren
- 0,9 ml 25 % SDS zugeben (Endkonzentration 0,5 %) und schnell mit Hilfe eines Wasserbades auf 65°C bringen
- 10-15 min bei 65°C kräftig rühren (Inaktivierung von Nukleasen)
- in einem Wasserbad auf 50°C abkühlen und mit verdünnter HCl-Lösung vorsichtig ungefähr pH 7 einstellen
- 0,5 ml Proteinase K (20 mg/ml) zugeben und 20 min bei 50°C rühren
- 11 ml 5 M Na-Perchlorat-Lösung (Endkonzentration 1 M) zufügen
- mit gleichem Volumen CIA (C.2.3.1) 20 min schütteln
- 10-20 min abzentrifugieren (12 000 x g, 20°C)
- mit einer großvolumigen Glaspipette CIA (= Unterphase) quantitativ abziehen
- nochmal 10 min zentrifugieren und wäßrige DNA-Phase vorsichtig mit einer Pipette von der Protein-Interphase abziehen
- zur wäßrigen Phase gleiches Volumen Äthanol (Raumtemperatur) geben und die ausgefällte DNA am Glasstab aufwickeln
- DNA in 10 ml sterilem TE (C.2.3.1) lösen

- 1 ml RNase (1 mg/ml, 10 min gekocht und langsam abgekühlt)
  + 1 mg α-Amylase zugeben
  und 30 min bei 37°C inkubieren
- 0,5 mg ungelöste Proteinase K zugeben
  und über Nacht bei 50°C inkubieren
- mit gleichem Volumen TE-gesättigtem Phenol 20 min schütteln
- 10 min bei 8000 x g, 20°C abzentrifugieren
- Phenolphase (unten) mit Pipette abziehen
- nochmal abzentrifugieren und wäßrige DNA-Phase (oben) abnehmen
- 1 ml 3 M Na-Acetat (Endkonzentration 0,3 M)
  und das 2,5-fache Volumen Äthanol (Raumtemperatur) zugeben
  und gefällte DNA am Glasstab aufwickeln
- DNA in 4,5 ml TE lösen
- 0,5 ml 3 M Na-Acetat (Endkonzentration 0,3 M) zugeben
  und DNA durch langsames Zutropfen von Isopropanol (0,56 - 0,65-faches Volumen) fällen
  (nur große DNA-Bruchstücke werden ausgefällt, RNA und Oligonukleotide bleiben in Lösung)
- DNA-Klümpchen mit Glasstab herausfischen, leicht abfönen,
  in feuchtem Zustand in gewünschtem Volumen TE lösen
  und bei 4°C aufbewahren.

3.2 Sarkosyl-Lyse

Dieser Zellaufschluß, modifiziert nach Bazaral und Helinski (1), eignet sich ebenfalls zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Rhizobium meliloti-Stämmen. Man erhält vergleichbare DNA-Konzentrationen wie bei der Lyse-Methode nach Müller (C.3.1).

Für 30-50 ml Rhizobien-Übernachtkultur gelten folgende Angaben:

- Bakterien niedertourig abzentrifugieren
  (12 000 x g, 10 min, 5°C)
- Sediment in 2 ml 20 % Sucrose in TES (C.2.3.1) resuspendieren
- 2 ml Lysozym-Lösung (C.2.3.1) zugeben und
  1 h bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- 0,4 ml Sarkosyl-Lösung (C.2.3.1) zufügen und
  sofort 15 min in einem 65°C-Wasserbad inkubieren
  (Aufklaren der Suspension und Inaktivierung von Nukleasen)
- falls die DNA-haltige Suspension zu zäh ist, mit einigen ml TE
  (C.2.3.1) verdünnen

- das Lysat mit einer 10 ml-Einmalspritze ohne Nadel durch ca. 10-maliges Aufziehen scheren, um die Viskosität etwas zu reduzieren
- 2 ml Lysat zusammen mit 2,6 ml TES, 0,4 ml EtBr (10 mg/ml, in TES) und 5 g CsCl in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen für den Beckman-Ti 50-Rotor füllen und gut durchmischen
- CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.3.5).

3.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von "cleared lysates"

Zur Isolierung von Hybridplasmiden aus E.coli wurde eine Variation der Methode von Glover (19) verwendet. Dabei bewirkt das Detergenz Triton X-100 nur eine partielle Zerstörung der Zellmembran, so daß kleinere Plasmide die Zelle verlassen können, während die hochmolekulare chromosomale DNA an Membranbruchstücke gebunden bleibt und durch Zentrifugation sedimentiert wird. Der Überstand bildet das "cleared lysate" mit einem hohen Anteil an Plasmid-DNA.
Folgende Angaben gelten für 100 ml Bakterien-Übernachtkultur:

- Zellen durch niedertourige Zentrifugation ernten (15 000 x g, 10 min, 4°C)
- resuspendieren in 1 ml kalter 25 % Sucrose in TE, pH 8 (C.2.3.1)
- 1 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml H_2O) zugeben, gut mischen und 10 min bei 0°C inkubieren
- 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,5) zufügen und 5 min bei 0°C schütteln
- 2,5 ml Triton X-100-Lösung (C.2.3.1) zugeben und 10 min bei 0°C leicht schütteln
- die aufgeklarte Suspension mehrmals durch eine 10 ml-Spritze ohne Kanüle ziehen (Befreiung von Plasmiden, die im Chromosom festhängen)
- Abzentrifugieren der Zellbruchstücke zusammen mit einem großen Teil chromosomaler DNA (48 000 x g, 60 min, 2°C)
- vom Überstand (="cleared lysate") 5 ml zu 5 g CsCl und 0,3 ml EtBr (10 mg/ml) in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen für den Beckman-Ti 50-Rotor füllen
- CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.3.5).

3,4 Isolierung von Plasmid-DNA nach Hansen & Olsen

Eine modifizierte und vereinfachte Art des von Hansen und Olsen (21) beschriebenen Verfahrens erlaubt die Isolierung großer Plasmide aus Rhizobien in größerem Maßstab.
Durch einen SDS-Hitze-Schritt werden die Plasmide aus ihrer Assoziation mit dem Chromosom befreit. Werden zusätzlich Scherkräfte durch Pipettieren oder starkes Schütteln weitgehend vermieden, so können intakte Plasmide in der CCC-Form erhalten werden.
Die folgenden Angaben beziehen sich auf 350 ml-Übernachtkulturen:

- Bakterien durch niedertourige Zentrifugation ernten (15 000 x g, 10 min, 5°C)
- in 20 ml TE-Olsen (C.2.3.1) waschen
- abzentrifugieren (12 000 x g, 10 min, 5°C) und Sediment in 20 ml 25 % Sucrose in TES (pH 8) resuspendieren
- in silikonisiertes 250 ml-Becherglas umfüllen und in Eis stellen
- 10 ml Lysozymlösung (C.2.3.1) zugeben und 15 min in Eis langsam schütteln
- 10 ml 250 mM EDTA (pH 8,0) zugeben und 5 min in Eis stehen lassen
- 25 ml auf 65 - 70°C vorgewärmtes 20 % SDS (in TE-Olsen) zugeben (die Suspension klart rasch auf) und sofort in ein 65°C-Schüttelwasserbad stellen
- 5-10 min sanft schütteln
- heiß in Zentrifugenbecher (für den Beckman-JA14-Rotor) einfüllen
- 25 ml 5 M NaCl zugeben, schnell durch Drehen mischen und 6 h oder länger in Eis stehen lassen
- SDS-NaCl-Niederschlag abzentrifugieren (15 000 x g, 20 min, 4°C) (Chromosom-Membran-Komplexe werden sedimentiert)
- Überstand in silikonisierten 100 ml-Erlenmeyerkolben gießen und Volumen abmessen
- das 0,32-fache Volumen an PEG 6000-Lösung (C.2.3.1) zugeben und durch Drehen gründlich mischen
- 6 h oder länger in Eis stellen
- den DNA-PEG-Niederschlag im Ausschwing-Rotor abzentrifugieren (4600 x g, 5-10 min, 4°C)
- Überstand abgießen und PEG-Reste mit Filterpapier absaugen
- DNA-haltiges Sediment in 3,6 ml TE-Olsen durch leichtes Drehen lösen

- in einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen für einen Beckman-Ti 50-Rotor 8 g CsCl in 4 ml TE-Olsen lösen und 0,25 ml EtBr (20 mg/ml) und die DNA-Suspension zugeben
- CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.3.5).

3.5 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

Intercalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid (EtBr) lagern sich in DNA ein und erniedrigen dadurch ihre Dichte. Dabei können sich in lineare oder OC-DNA mehr EtBr-Moleküle einschieben als in CCC-DNA. Folglich bandiert CCC-DNA im Dichtegradienten unterhalb der OC- + linearen Form.

Polyallomer-Röhrchen mit CsCl-EtBr-DNA-Lösungsgemisch (vgl. C.3.2 - C.3.4) werden verschlossen und mit dünnflüssigem Paraffin randvoll aufgefüllt. Die Gleichgewichtszentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Kontron Ultracentrifuge TGA) erfolgt 48 - 72 h bei 34 000 rpm (105 000 x g) 20°C.
Nach dem Lauf wird der DNA-EtBr-Komplex durch Bestrahlen mit langwelligem UV-Licht (360 nm) zum Fluoreszieren gebracht und mit einer Spritze durch seitliches Anstechen des Röhrchens abgezogen.

3.6 Aufbereitung der DNA aus CsCl-EtBr-Dichtegradienten

Aus den isolierten DNA-Fraktionen wird EtBr durch zweimaliges Ausschütteln mit Isobutanol entfernt. Im Falle von großen Rhizobien-Plasmiden unterbleibt dieser Schritt, da das später zugesetzte Phenol auch gleichzeitig die DNA-Lösungen entfärbt.
Zur Entfernung von CsCl werden die Proben 1 h oder länger gegen TE (C.2.3.1) dialysiert (die Dialyseschläuche werden vorher in TE autoklaviert) und anschließend zweimal mit gleichen Volumina TE-gesättigtem Phenol deproteinisiert. Darauf folgen 4 Dialyseschritte gegen TE über jeweils mindestens 3 h.
Zur Konzentrierung der DNA-Lösungen kann nach dem 2.Dialyseschritt eine Dialyse gegen 10 % PEG (PEG 40 000 in TE) erfolgen.
Die so erhaltenen DNA-Lösungen werden bei 4°C oder -20°C aufbewahrt. Gegebenenfalls können sie auch durch Einengung der Flüssigkeitsmenge mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (vgl. C.5.1) stärker konzentriert werden.

3.7 Konzentrationsbestimmung

Mit einem Spektralphotometer (Gilford Typ 250) wird ein Spektrum der 1:10 verdünnten DNA-Probe zwischen 320 - 220 nm aufgenommen. Dabei errechnet sich die DNA-Konzentration aus der gemessenen optischen Dichte (o.D.) bei 254 nm unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Beziehung 1 o.D. = 50 µg DNA / ml.
Gleichzeitig gibt diese Methode Auskunft über die Reinheit der DNA, da die Absorption bei 235 nm ein Maß für den Proteingehalt der DNA-Lösung ist, und für proteinfreie DNA die Beziehung

$$\frac{\text{o.D.-Wert}_{254\ nm}}{\text{o.D.-Wert}_{235\ nm}} \geq \frac{2}{1} \qquad \text{gilt.}$$

4. Restriktionsanalyse der isolierten DNA

4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die für Verdauungen mit Restriktionsendonukleasen eingesetzten DNA-Mengen richten sich nach der Konzentration der betreffenden DNA und der Anzahl der auftretenden Fragmente.
Die DNA-Spaltungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
EcoRI und HindIII: 10 mM Tris/HCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, pH 7,5.
XhoI und BamHI: 6 mM Tris/HCl, 6 mM $MgCl_2$, 6 mM Mercaptoäthanol, pH 7,9.
Bei EcoRI, XhoI und BamHI wurden 1 - mehrere µl unverdünnte Enzym-Lösung eingesetzt, so daß eine vollständige Spaltung der DNA erreicht werden konnte. HindIII wurde bei Verdauungen chromosomaler DNA unverdünnt verwendet, bei Plasmidspaltungen war eine 1:10-Verdünnung ausreichend (jeweils 1 µl, stabilisiert mit 1 µl durch Abkochen inaktiviertes EcoRI).
Die Ansätze wurden im Fall von chromosomaler DNA mindestens 2 h, bei Plasmiden wenigstens 1 h oder länger bei 37°C inkubiert, dann durch Zugabe eines Tropfens Stop-Lösung (C.2.3.2) abgestoppt und dadurch gleichzeitig für die Elektrophorese vorbereitet.
Bei Doppelverdauungen mit Enzymen, die verschiedene Reaktionsbedingungen beanspruchen, wurde die erste Spaltung durch Hitzebehandlung (10 min 70°C) beendet. Um das Probenvolumen nicht zu groß werden zu lassen, wurden die Salzkonzentrationen für das zweite Enzym mit 10-fach konzentrierten Pufferlösungen eingestellt. Die zweite Verdauung wurde wieder durch Zugabe von Stop-Lösung abgebrochen.
Für unvollständige Verdauungen wurde die Enzymmenge oder die Reaktionszeit herabgesetzt.

4.2 Gel-Elektrophorese (53)

Zur Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente dienten vertikale Agarose-Plattengele (18 x 13 x 0,5 cm^3). Die verwendete Apparatur zur Gel-Elektrophorese wurde nach der Vorschrift von Dr.Blohm (GBF, Braunschweig-Stöckheim) in unserem Institut nachgebaut.
Die Gelkonzentrationen variierten zwischen 0,7 - 3 %. Laufzeiten und Laufbedingungen waren davon abhängig, ob DNA-Fragmente mit höherem oder niedrigerem Molekulargewicht besser aufgetrennt werden

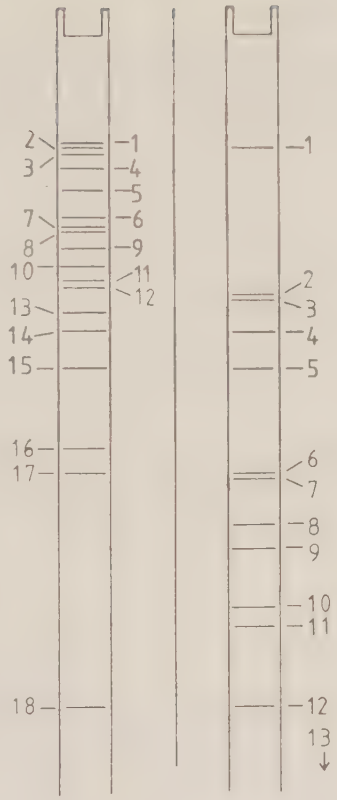
sollten. Diese Angeben sind jeweils den Legenden der Abbildungen zu entnehmen.
Im Anschluß an die Elektrophorese werden die Gele 45 min in EtBr-Lösung (1 - 2,5 µg/ml H_2O) gefärbt und im UV-Auflicht (254 nm; Mineralight Lamp model R-52, Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, California, USA) fotografiert (Polaroid MP-4 Land Camera, Polaroidfilm Typ 665). Gleichzeitig wird eine Lineal mit fotografiert, um später 1:1-Vergrößerungen der Gelbilder mit den dazugehörigen Autoradiographien vergleichen zu können.

4.3 Längenbestimmung der DNA-Fragmente

Zur Ermittlung der kb-Werte der DNA-Fragmente werden die Wanderungsstrecken der Banden im Gel bzw. in der Autoradiographie ausgemessen.
Auf jedes Gel werden Proben mit DNA-Fragmenten bekannter Länge aufgebracht. Der Logarithmus der Wanderungsstrecken der einzelnen Fragmente wird gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Aus der so erstellten Eichkurve kann die Größe der unbekannten Fragmente ermittelt werden.
Als Längenstandards für den Bereich zwischen ca. 2 - 20 kb wurde eine als "Marker-Mix" bezeichnete Fragmentmischung nach Spitzbarth (56) verwendet (Abb.1a). Zur Längenbestimmung von Fragmenten kleiner 2 kb diente EcoRI + HindIII - gespaltene Lambda-DNA (Abb.1b). Fragmentgrößen oberhalb von 12 kb und unterhalb von 0,5 kb ließen sich nur abschätzen.

a)

1) λ-H-1: 23,6
2) λ-E-1: 21,7
3) λ-S-1: 20,0
4) pSC101/ColE1-H: 16,5
5) λ-S-2: 12,5
6) λ-H-2: 9,64
7) λ-S-3: 8,75
8) λ-S-4: 8,4
9) λ-E-2: 7,52
10) λ-H-3: 6,64
11) λ-E-3: 5,83
12) λ-E-4: 5,64
13) λ-E-5: 4,85
14) λ-H-4: 4,34
15) λ-E-6: 3,48
16) λ-H-5: 2,26
17) λ-H-6: 1,98
18) λ-H-7: 0,56



b)

1) 21,7
2) 5,15
3) 5,0
4) 4,27
5) 3,48
6) 1,98
7) 1,90
8) 1,59
9) 1,37
10) 0,94
11) 0,83
12) 0,56
13) 0,14

Abb.1: Als Längenstandards verwendete DNA-Fragmente (in kb)

a) "Marker-Mix", zusammengesetzt aus folgenden DNA-Verdauungen:
λcI 857-DNA + EcoRI (41),
λcI 857-DNA + HindIII (41),
λcI 857-DNA + SmaI (60) und
pSC101-ColE1 + HindIII (60).

b) λcI 857-DNA + EcoRI + HindIII als Längenstandard zur Größenbestimmung kleinerer DNA-Fragmente (42).

5. DNA-DNA-Hybridisierung

5.1 Radioaktive Markierung von DNA durch "Nick-Translation"

Die Methode der "Nick-Translation" liefert DNA mit gleichmäßiger radioaktiver Markierung und hoher spezifischer Aktivität (38, 49). Als Starter der Nick-Translation-Reaktion dienen geringe Konzentrationen an DNase I, durch die Einzelstrangbrüche ("nicks") mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden über die ganze Länge der DNA-Moleküle statistisch verteilt eingeführt werden. Kornberg-Enzym (DNA-Polymerase I) setzt daraufhin an diesen Bruchstellen bei niedrigen Temperaturen von 15 - 20°C (38) eine Reparatur-Synthese in Gang: Von den 5'-Phosphat-Enden der Einzelstrangbrüche werden Nukleotide entfernt (5' → 3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms), und an die 3'-Hydroxyl-Enden der "Nicks" werden neue Triphosphate sequenzgetreu anpolymerisiert (Polymerase-Aktivität). Dabei können die vorher unmarkierten Nukleotide durch radioaktive (z.B. ^{32}P-α-dATP) ersetzt werden, die dann ebenso gleichmäßig wie die Einzelstrangbrüche über das ganze DNA-Molekül verteilt sind.

Durchführung der Nick-Translation (modifiziert nach Rigby et al. (49)):
60 µCi ^{32}P-α-dATP (1 mCi/ml) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß werden mit Hilfe einer Vakuum-Tischzentrifuge eingetrocknet (Speed Vac Concentrator, Savant) und danach in 50 µl Polymerase I-Puffer (C.2.3.3) aufgenommen.
Der Reaktionsmischung werden zugesetzt

- 40 µl DNA-Lösung (125 - 200 µg DNA/ml)
- nicht-radioaktive Triphosphate: je 5 µl 800 µM dCTP, dGTP und dTTP
- 10 µl DNase I (200 ng/ml in einer Lösung von 100 µg Rinderserumalbumin pro ml)
- 8 - 10 Einheiten DNA-Polymerase I (= ca. 2 µl bei 5000 Einheiten pro ml).

Reaktionsdauer: ≥ 2 h bei 19°C.

Nach Zugabe von 150 µl H_2O zur Volumenvergrößerung wird die Reaktion mit 250 µl Phenol (gesättigt mit TE, pH 7,5 (C.2.3.1)) abgestoppt und die wäßrige proteinfreie DNA-Phase mit Hilfe von Sephadex G-50 (medium grade; Säule = silikonisierte kurze Pasteurpipette) mit TE als Elutionspuffer fraktioniert. 25 3-Tropfen-

Fraktionen und 15 5-Tropfen-Fraktionen werden in Eppendorfreaktionsgefäßen gesammelt (sie enthalten meist die gesamte eingesetzte Radioaktivität) und im Beckman LS-230-Scintillationszähler ausgezählt, wobei die Eppendorfreaktionsgefäße lediglich in Scintillatorgläschen gehängt werden müssen (ohne Scintillatorflüssigkeit!)
Trägt man in einem Diagramm die gemessene Radioaktivität gegen die Fraktionsnummer auf, so ergeben sich zwei Gipfel; der erste Gipfel enthält die radioaktive DNA, der zweite die überschüssigen nicht eingebauten Nukleosid-Triphosphate. Die Fraktionen des ersten Gipfels werden vereinigt und stehen für die Hybridisierung (C.5.2.2) zur Verfügung oder können auch mehrere Tage bei -20°C gelagert werden.

Bei dieser Markierungstechnik werden mit ^{32}P meist Einbauraten um 75 % oder mehr erzielt; die spezifische Aktivität der markierten DNA wurde auf 5 - 10 x 10^6 cpm/µg DNA abgeschätzt.

5.2 Southern-Technik

Die von Southern (54) entwickelte Filterhybridisierungsmethode enthält folgende Schritte:

- Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten in einem Agarose-Gel
- alkalische Denaturierung der DNA im Gel
- Neutralisierung der DNA, um Einzelstrangbrüche und irreversible Denaturierung zu vermeiden
- Übertragung der einzelsträngigen DNA-Fragmente vom Gel auf NC-Filterpapier ("blotting") mittels eines speziellen Verfahrens (s. Abb.2)
- Hybridisierung der DNA im NC-Filter mit radioaktiver DNA oder RNA
- Autoradiographie des NC-Filters.

Beim "blotting" wird eine Salzlösung durch das Gel und das darauffliegende NC-Filter durchgesaugt, die die DNA aus dem Gel mittransportiert. Nitrocellulose hält einzelsträngige DNA fest. Auf diese Weise liegt nachher auf dem NC-Filter eine genaue Kopie des DNA-Fragmentmusters im Gel vor und kann mit den Banden in der Autoradiographie verglichen werden.

5.2.1 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter

Das gefärbte und fotografierte Agarosegel (C.4.2) wird für den "Southern-Transfer" folgender Behandlung unterzogen:

- Ausschneiden DNA-haltiger Bahnen aus dem Gel
- Denaturierung der DNA im Gel durch Inkubation in Denaturierungslösung (C.2.3.4), 45 min bei Raumtemperatur
- Denaturierungslösung mit einer Wasserstrahlpumpe gründlich absaugen
- Inkubation der Gelstreifen in Neutralisierungslösung (C.2.3.4), ca. 60 min bei Raumtemperatur.

Die nunmehr einzelsträngige DNA wird dann mit der Anordnung in Abb.2 aus dem Gel auf NC-Filter übertragen:
3 Lagen eines saugfähigen, wenig fusselnden Filterpapiers (Whatman 3 MM) tauchen in eine Salzlösung (6xSSC). Darauf liegen ein Gelstreifen und in einem Abstand von ca. 2 mm rechts und links daneben Abstandshalter (Plexiglas). In H_2O und 6xSSC eingeweichte NC-Streifen werden überlappend auf das Gel gelegt, wobei der rechte und linke Rand des Filters auf den Abstandshaltern aufliegt. Es ist zu beachten, daß Luftblasen zwischen Gel und Whatman-Filterpapier und zwischen Gel und NC-Filter durch vorsichtiges Herausstreifen entfernt werden.
Zwei schmale mit 6xSSC befeuchtete Whatman 3MM-Streifen (Starthilfe des Saugvorganges) werden überlappend auf das NC-Filter gelegt. Darauf folgt ein Stapel aus trockenen Whatman 3MM-Filtern und Papierhandtüchern, Zellstoff oder anderem saugfähigen Papier.
Die Lücken zwischen Gel und Abstandshaltern müssen unbedingt flüssigkeitsfrei sein, um die Ausbildung von Flüssigkeitsbrücken außen am Gel vorbei zu den darüberliegenden Filterpapierschichten zu verhindern.
Eine Glasplatte zur gleichmäßigen Verteilung des Drucks deckt die ganze Anordnung ab; ein Gewicht sorgt dafür, daß der Flüssigkeitssog nicht zu stark wird, wodurch einzelsträngige DNA bis in die (Whatman-)Papierstapel hochgezogen werden könnte.
Man läßt den Transfervorgang am besten über Nacht ablaufen (ca. 16 - 20 h, $4^{o}C$ oder Raumtemperatur).
Danach wird der stark geschrumpfte Gelstreifen (infolge des hohen Salzgehalts des 6xSSC) vorsichtig vom NC-Streifen abgezogen, das NC-Filter 15 min bei Raumtemperatur in 2xSSC gewaschen und die einzelsträngige DNA durch einen Hitzeschritt (3 h oder länger, $80^{o}C$)

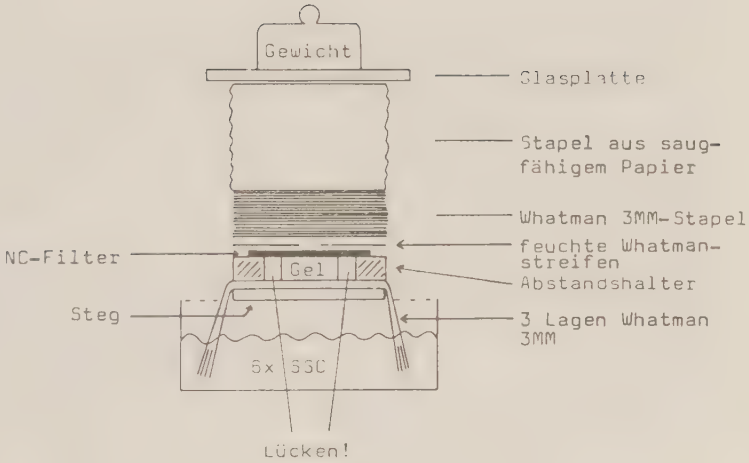


Abb.2: Versuchsaufbau zur Übertragung von DNA aus Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter nach Southern (54).

im Trockenschrank an die Nitrocellulose fixiert. Die NC-Filter können darauf bis zu mehreren Monaten im Kühlschrank gelagert werden.

5.2.2 Hybridisierung

Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA (modifiziert nach J.Collins (61)) erfordert eine gründliche Absättigung der NC-Filter, an denen bereits - entsprechend den Banden im Gel - einzelsträngige DNA gebunden ist (C.5.2.1):

- In passende (Plexiglas-)Tröge mit gut schließendem Deckel auf 68°C vorgewärmte 10 x Denhardt-Lösung einfüllen
- die trockenen NC-Filter in einer vorgewärmten SET/SDS-Lösung (4 x SET, 0,1 % SDS) benetzen und in die 10 x Denhardt-Lösung gleiten lassen (mehrere übereinander)
- Tröge verschließen und 2 h bei 68°C im Wasserbad inkubieren, ab und zu schwenken.

Unmittelbar nach dieser Inkubation werden die NC-Filter in der gleichen Weise ohne Zwischentrocknung 1 h bei 68°C in Hybridisierungspuffer der folgenden Zusammensetzung inkubiert:

50 ml H_2O
40 ml 10 x SET
10 ml 100 x Denhardt-Lösung
1 ml 10 % Na-Pyrophosphat
1 ml 10 % SDS
denaturierte Lachssperma- (oder Kalbsthymus-)DNA, (Endkonzentration 50 µg/ml).

Die Lachssperma-DNA wird folgendermaßen vorbehandelt:

- 1 ml DNA-Lösung (5 mg/ml) + 0,5 ml 1N NaOH (0,3 N Endkonzentration) kurz zum Kochen bringen
  (Strangtrennung + Aufbrechen der hochmolekularen DNA in kürzere Ketten)
- sofort in Eis abschrecken (Aufrechterhaltung des denaturierten Zustandes)
- 1M Tris (pH 7,4) und 0,5 ml 1N HCl zur Neutralisierung zugeben
- diese DNA-Lösung dem Hybridisierungspuffer zusetzen.

In analoger Weise wie die beiden vorhergehenden Inkubationen erfolgt die Hybridisierung 12 - 24 h bei 68°C. Dabei wird einem möglichst kleinen Volumen Hybridisierungspuffer die durch Nick-Translation (C.5.1) radioaktiv markierte DNA zugesetzt. Diese wird vorher durch Zugabe von 1/3 Volumen 1N NaOH (Endkonzentration 0,3 N) denaturiert.

Zur Ablösung unspezifisch gebundener radioaktiver DNA sind die NC-Filter nach der Hybridisierung sorgfältig zu waschen:

- Die radioaktiven NC-Filter aus den Hybridisierungströgen vorsichtig herausziehen und in Gefäße mit auf 68°C vorgewärmter Waschlösung (3 x SET, 0,1 % SDS, 0,1 % Na-Pyrophosphat) gleiten lassen,
  20-30 min bei 68°C schwenken
- in der gleichen Lösung jedes Filter einzeln 30 min bie Raumtemperatur schwenken
- 30 min in 1 x SET, 0,1 % SDS, 0,1 % Na-Pyrophosphat waschen
- 10 min in 1 x SET waschen.
- NC-Filter auf Whatman 3MM-Papier trocknen (1/2 - 1 h, 80°C).

5.2.3 Autoradiographie

Die gebildeten DNA-Hybrid-Moleküle auf den NC-Filtern werden durch Autoradiographie nachgewiesen.
Ein Röntgenfilm (Kodak, X-omat R film, X R-5) wird auf die Filter gelegt und einige Tage bis mehrere Wochen bei -70°C, mindestens aber bei -20°C belichtet. Der Film kann durch kurzes Vorbelichten (meca-blitz, Metz 185) sensibilisiert werden (30).
Der Film wird in Roentogen (1:5 in Wasser) entwickelt und mit Superfix (1:6 in Wasser) fixiert (beides: Tetenal-Photowerk, Hamburg-Berlin).

6. Nodulierung von Luzerne

6.1 Pflanzenanzucht und Infizierung mit Bakterien
(modifiziert nach Vincent (58))

Luzerne-Samen werden in einer 0,1%-igen $HgCl_2$-Lösung sterilisiert, in sterilem H_2O gewaschen und zum Auskeimen für 2-3 Tage auf Vollmedium-Agarplatten (z.B. TY (C.2.1)) gelegt.
50 ml-Erlenmeyerkolben werden etwa 2 cm hoch mit feinem gewaschenem Kies gefüllt, mit einer Glaskappe verschlossen und bei 180°C sterilisiert. Mit steriler Jensen-Nährlösung (C.2.1) wird der Kies gerade bedeckt und in ihn in jedem Kölbchen ein angekeimter Same mit Hilfe einer abgeflammten Pinzette eingepflanzt.
Aus Rhizobium meliloti-Bakterien von einer Stammplatte wird in sterilem H_2O eine dicke Suspension hergestellt und 0,3 ml davon auf jedes Pflänzchen pipettiert. Mindestens 10 Parallelkölbchen pro Bakterienstamm werden angelegt.
Im 17-Stunden-Tag bei 20 - 23°C werden die Pflanzen 4 - 6 Wochen lang kultiviert. Gelegentlich wird etwas steriles H_2O nachgefüllt.

Induzieren die Rhizobien an den Luzernewurzeln Knöllchen und wird darin effektiv Stickstoff fixiert, so entstehen kräftige grüne Pflanzen. Im Falle einer ineffektiven Nodulierung bilden die Pflanzen nur wenige unscheinbare gelbliche Blätter aus und sterben schließlich ab.

6.2 Reisolierung von Bakterien aus Wurzelknöllchen

Ein möglichst großes Knöllchen wird von der Wurzel abgeschnitten, durch Untertauchen in Äthanol sterilisiert und ganz kurz abgeflammt. Zur Sterilitätskontrolle wird die Knöllchenoberfläche auf einer TY-Platte (C.2.1) über den Agar gestreift.
Mit einer sterilen Rasierklinge werden vom Knöllchen Längsschnitte angefertigt (sterile Handschuhe!) und auf TY-Platten ausgestrichen. Nach mehreren Tagen Bebrütung bei 30°C haben sich Bakterienkolonien entwickelt.

D. Ergebnisse

1. DNA-Isolierung

1.1 Gesamt-DNA

Bei Rhizobium meliloti 20-1 und R.leguminosarum 300 wurden Vorkulturen in B+Y und Hauptkulturen in TY angesetzt, R.meliloti MVII/1 und L5-30 wurden in RGMC und Klebsiella pneumoniae M5a1 in PA angezogen. Die daraus nach W.Müller (C.3.1) isolierte Gesamt-DNA-Lösung enthielt 250 - 400 µg/ml DNA und war weitgehend proteinfrei (UV-Absorption zwischen 220 und 320 nm, C.3.7).

Aus den R.meliloti-Stämmen E1 - E12 wurde nach Anzucht in RGMC oder TY Gesamt-DNA in entsprechender Konzentration durch Sarkosyl-Lyse (C.3.2) und anschließender CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.3.5) gewonnen.

Auch die Methode nach Hansen & Olsen (C.3.4) ist zur Isolierung von Gesamt-DNA geeignet (obere Bande im CsCl-EtBr-Gradienten, die chromosomale DNA und Plasmidbruchstücke enthält). Eine Konzentrierung über PEG 40 000 (C.3.6) ist zweckmäßig.

1.2 Rhizobium-Plasmide

Plasmide aus Rhizobium meliloti wurden nach Hansen & Olsen (C.3.4) isoliert. Aus dem CsCl-EtBr-Gradienten (C.3.5) wurden die Plasmidbanden (unterhalb der chromosomalen DNA-Bande) abgezogen. Bei der nachfolgenden Aufbereitung (C.3.6) wurde wegen der Labilität großer Plasmide auf die Entfärbung mit Isobutanol verzichtet. Zu empfehlen ist die Konzentrierung über PEG 40 000 und Vakuum-Zentrifugation.

1.3 Hybrid-Plasmide mit Genen aus der nif-Region von Klebsiella pneumoniae und Rhizobium meliloti und ihre Vektor-Plasmide

Die Zusammensetzung der verwendeten Hybridplasmide und ihrer Vektoren ist aus Abb.3 zu ersehen.
Nach Anzucht der entsprechenden E.coli-Stämme in PA mit geeignetem Antibiotikum-Zusatz (Ampicillin oder Tetracyclin) wird die Plasmid-DNA über "cleared lysates" (C.3.3) und CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Plasmidfraktionen werden nach Aufbereitung (C.3.6) mit PEG 40 000 auf ca. 50-100 µg DNA/ml konzen-

Abb.3: Zur Hybridisierung verwendete Hybrid-Plasmide mit nif-DNA aus K.pneumoniae und R.meliloti und ihre Vektoren:

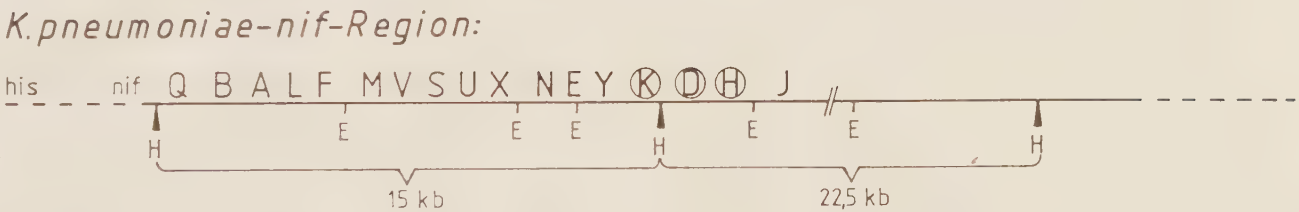


Abb.3a: Gesamte Region für N_2-Fixierung im Chromosom von K.pneumoniae MSa1 (9, 48) (eingerahmt: K.pneumoniae-nif-Strukturgene K, D, H).

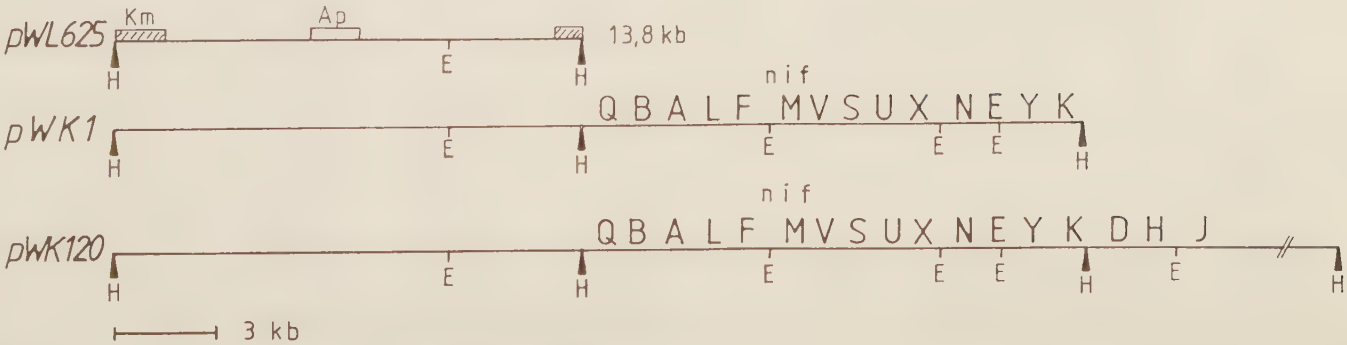


Abb.3b: Hybridplasmide mit dem Trägerplasmid pWL625, die die K.pneumoniae-nif-Region ganz oder teil-

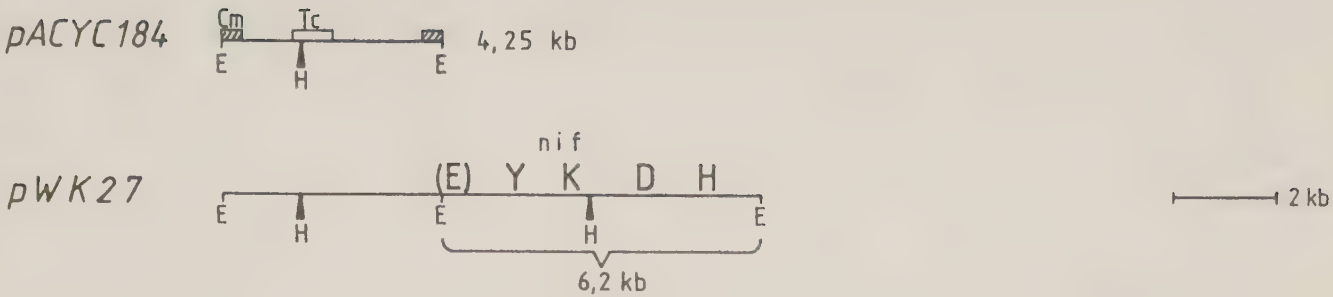


Abb.3c: Trägerplasmid pACYC184 und Hybridplasmid pWK27 mit den K.pneumoniae-nif-Genen YKDH auf einem EcoRI-Fragment (47).

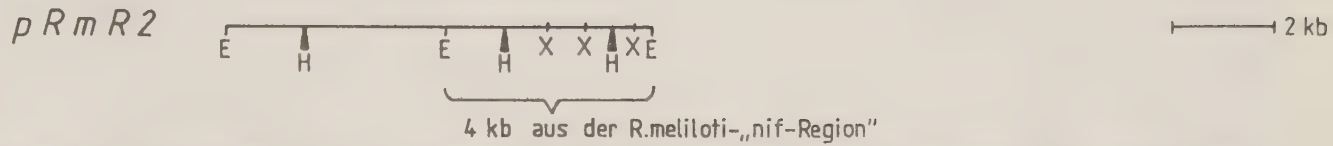


Abb.3d: Hybridplasmid pRmR2 aus dem Vektor pACYC184 und dem EcoRI-Fragment von R.meliloti, das die Sequenzhomologie zur K.pneumoniae-nif-Region enthält (52).
(H = HindIII, E = EcoRI, X = XhoI).

triert (C.3.6).

DNA für die Längenstandards (C.4.3) wurde von Dr.Rösch und Prof. Pühler, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

2. Hybridisierung von Rhizobium meliloti-Gesamt-DNA mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA

Da bei Rhizobium meliloti nicht bekannt war, ob die nif-Gene auf dem Chromosom oder einem der Plasmide lokalisiert sind, wurde zunächst ausschließlich mit Gesamt-DNA gearbeitet.
Um die R.meliloti-nif-Gene aufzufinden, wurde klonierte nif-DNA aus Klebsiella pneumoniae zur Hybridisierung verwendet. Da der Enzymkomplex für N_2-Fixierung in allen bisher untersuchten Stickstoff bindenden Mikroorganismen sehr ähnlich ist (vgl. Einleitung), sich die für die Regulation der N_2-Bindung verantwortlichen Gene in den freilebenden Klebsiellen und den symbiontisch N_2-fixierenden Rhizobien aber mit großer Wahrscheinlichkeit beträchtlich unterscheiden, schien es ratsam, zunächst nur die K.pneumoniae-Nitrogenase-Strukturgene KDH zu verwenden. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß bei Nick-Translation Radioaktivität weitgehend in zu R.meliloti-nif-Genen homologe Sequenzen eingebaut wurde und nicht durch Inkorporation in andere, nicht homologe Bereiche für die Hybridisierung verlorenging.

Für die Hybridisierungen wurde ausschließlich ^{32}P-markierte K.pneumoniae-nif-DNA in pWK27 verwendet. Hybridisierungen mit ^{3}H-markierter DNA von pWK1, pWK120 und pWK27 waren wegen der schwachen β-Strahlung dieses Isotops nicht auswertbar.

2.1 Das Plasmid pWK27

Die Fragmentgrößen des in Abb.4 dargestellten Hybridplasmids pWK27 (47) wurden über Agarosegelelektrophorese (vgl. Abb.20) ermittelt (C.4.3).
pWK27 ist aufgrund seiner hohen Kopienzahl in E.coli leicht zu isolieren. Der K.pneumoniae-DNA-Anteil enthält die Strukturgene nif K für die β-Untereinheit und nif D für die α-Untereinheit der Nitrogenase (Komponente I), nif H für die Nitrogenase-Reduktase (Komponente II) (50), das Regulationsgen nif Y, dessen Genprodukt bei der Transkription des Operons nif HDKY eine Rolle spielen soll (47, 62), und einen kleinen Teil von nif E (9, 47, 48), das für einen aktiven FeMo-Kofaktor der Nitrogenase kodiert.

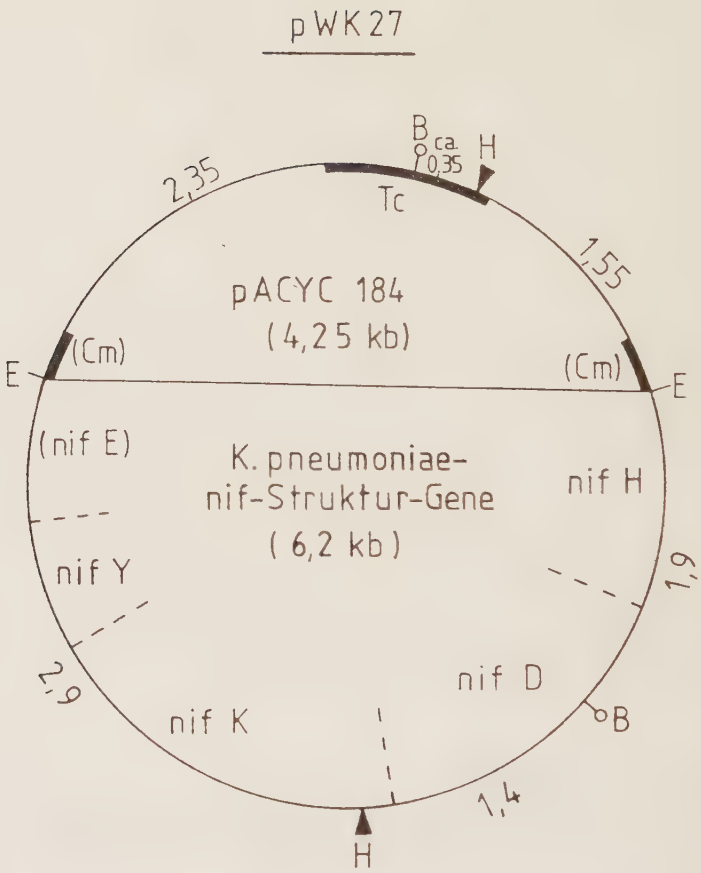


Abb.4: Hybrid-Plasmid pWK27 aus dem Trägerplasmid pACYC184 und dem EcoRI-Fragment von K.pneumoniae M5a1 mit den nif-Strukturgenen KDH und nif Y (47).
(Fragmentlängen in kb;
E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI).

2.2 Hybridisierungen von R.meliloti-DNA, verdaut mit den Restriktionsenzymen EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI

Für die Spaltung von Gesamt-DNA aus R.meliloti MVII/1, E1 - E12, 20-1 und L5-30 sowie R.leguminosarum 300 wurden die Restriktionsenzyme EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI ausgewählt, die diese Genome gleichmäßig in viele unterschiedlich lange Fragmente zerlegen. Die Fragmentmuster der R.meliloti-Stämme im Agarose-Gel zeigten mit Ausnahme von R.meliloti E12 große Ähnlichkeit untereinander. Bei R.leguminosarum 300 war keine Übereinstimmung mit einem der R.meliloti-Stämme festzustellen. Es waren daher zumindest für die R.meliloti-Stämme ähnliche Hybridisierungsergebnisse mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen in pWK27 zu erwarten.
Die Rhizobien-DNA-Fragmente wurden in 0,7%igen Agarose-Gelen aufgetrennt, auf NC-Filter übertragen und mit ^{32}P-marierter pWK27-DNA hybridisiert (C.5). Aus den Autoradiogrammen wurden die Längen der Hybridfragmente anhand des Längenstandards (C.4.3) im Gel errechnet.

2.2.1 EcoRI- und XhoI-Verdauungen

In den Autoradiogrammen der EcoRI-Verdauungen (Abb.5) wurden bei allen R.meliloti-Stämmen einheitlich eine sehr kräftige Hybridbande bei etwa 4 kb und eine viel schwächere bei 1,8 - 2 kb gefunden, bei R.leguminosarum 300 dagegen eine dicke Bande bei 2,5 kb, dünne Banden bei 4,2 und 1,9 kb.

Bei XhoI-Spaltungen (Abb.6) ergaben sich die ersten größeren Unterschiede bei R.meliloti: Meist tauchte ein sehr langes Hybridfragment von 18 - 20 kb auf, bei E2 und E6 nur von 9 kb; bei E12 waren es 2 Banden von 6,5 und 1,6 kb, und E7-DNA war nicht XhoI-spaltbar. R.leguminosarum 300 hatte Hybridfragmente von 3,7 und 1,3 kb.

EcoRI/XhoI-Doppelverdauungen (Abb.7) führten bei R.meliloti zu 2 kb-Hybridbanden mit Ausnahme von E12 mit einer entsprechend dikken Bande bei 1,6 kb und E7, das wegen der fehlenden XhoI-Erkennungsstellen das EcoRI-Hybridisierungsmuster zeigte, und bei R.leguminosarum 300 zu einer 1,5 kb-Bande.

Die Kontrollhybridisierung mit dem ^{32}P-markierten Trägerplasmid pACYC184 von pWK27 wurde mit EcoRI-gespaltener DNA von sämtlichen R.meliloti-Stämmen, R.leguminosarum 300 und K.pneumoniae M5a1 durchgeführt. In keinem der Fälle trat Hybridisierung auf (vgl. Abb.19 A und 20 C,D).

Gel:
M MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11
Autoradiogramm:
MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10

Abb.5b

Abb.5:

Gel-Elektrophorese EcoRI-gespaltener Gesamt-DNA

a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E11 (0,7 % Agarose, 14 h 30 V, 4°C)

b) R.meliloti MVII/1, E12, 20-1 und L5-30 und R.leguminosarum 300 (0,7 % Agarose, 16 h 25 V, 4°C)

und Autoradiogramme nach Transfer der DNA auf NC-Filter und Hybridisierung mit ^{32}P-pWK27-DNA.

(MM = "Marker-Mix" als Längenstandard).

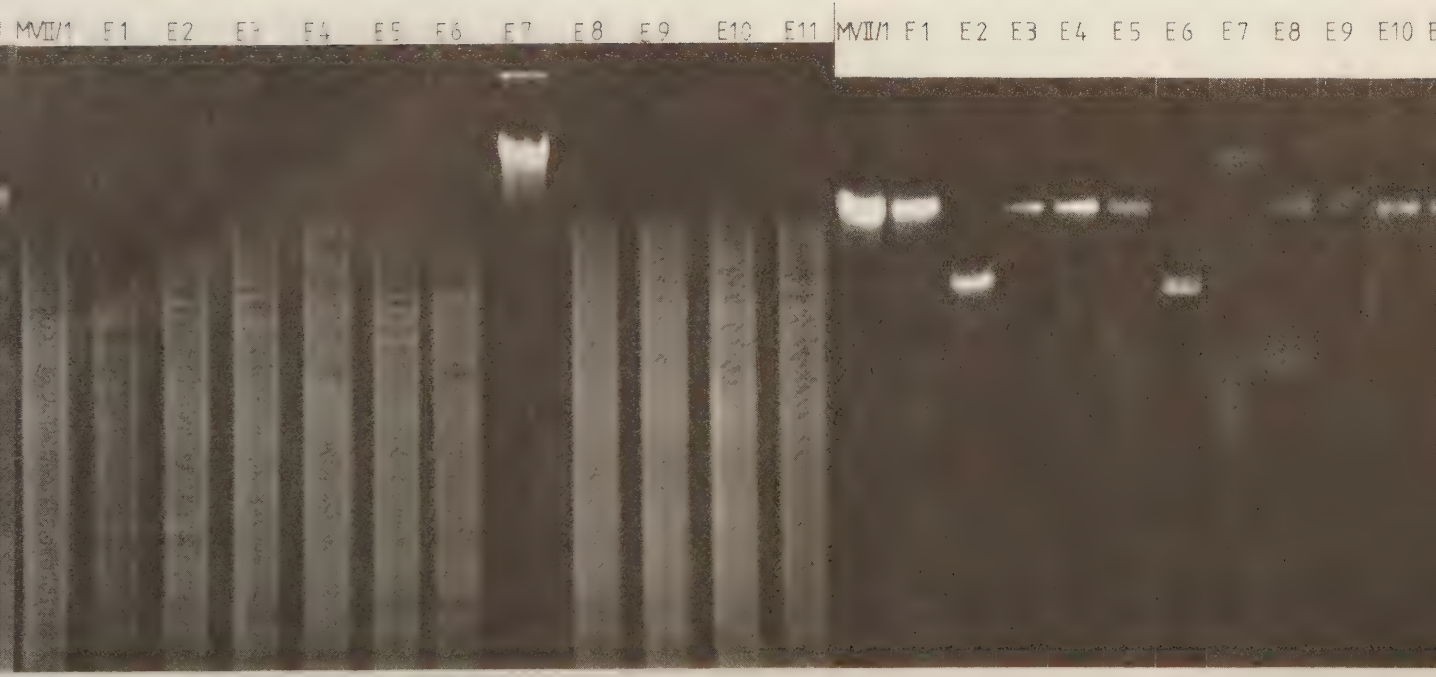
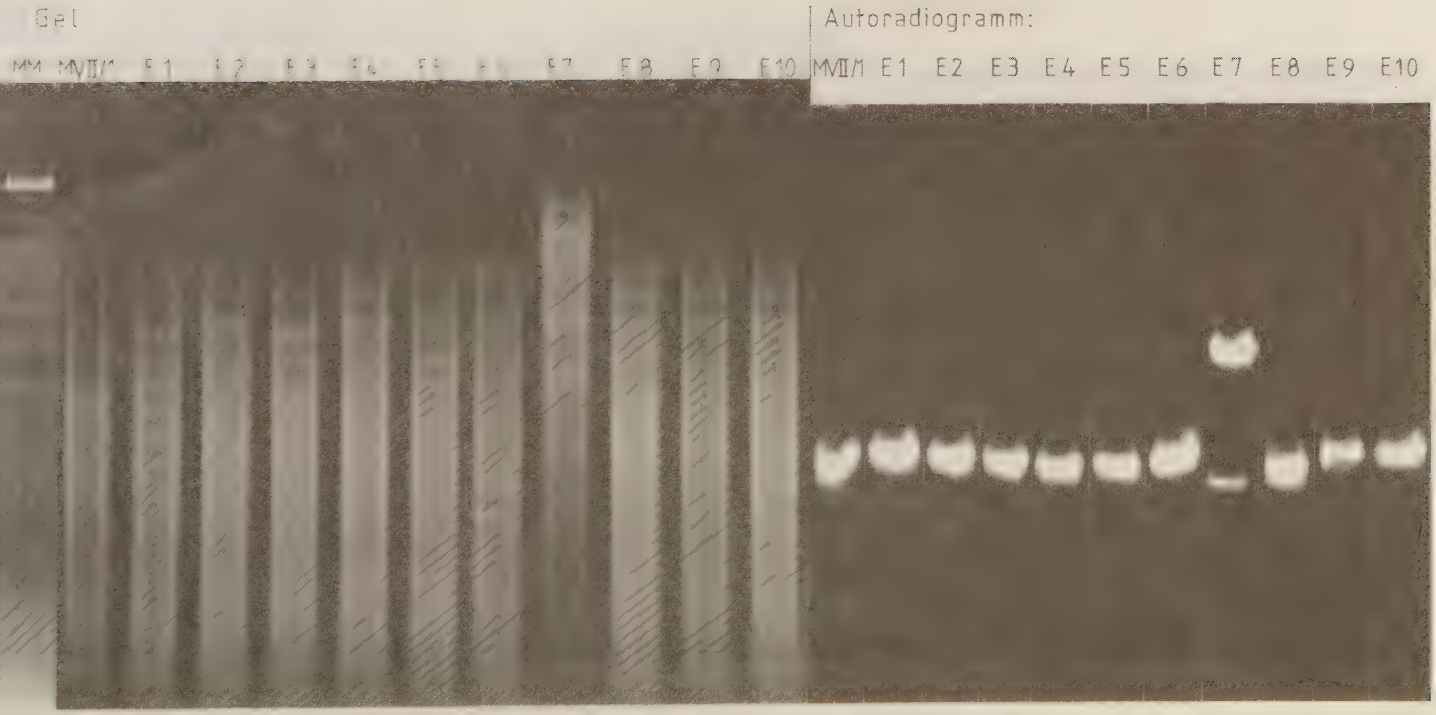

MVII/1 F1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11
MVII/1 F1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10

Abb.6a

Abb.6b

Abb.6:
Gel-Elektrophorese XhoI-verdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E11 (0,7 % Agarose, 17 h 25 V, 4°C),
b) R.meliloti E12, 20-1 und L5-30 und R.leguminosarum 300 (0,7 % Agarose, 16 h 25 V, 4°C)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix").


Gel
Autoradiogramm:
MM MVIII E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10
MVIII E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10

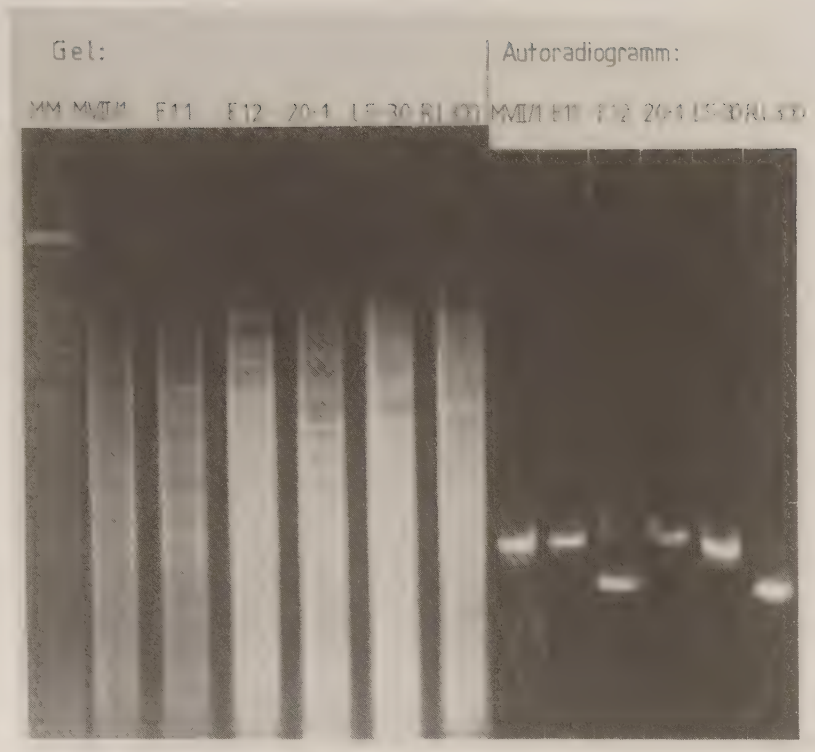


Abb.7b

Abb.7:
Gel-Elektrophorese (EcoRI/XhoI-doppelverdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E10
(0,7 % Agarose, 16 h 20 V, 4°C)
b) R.meliloti MVII/1, E11, E12, 20-1 und L5-30 und R.leguminosarum 300
(0,7 % Agarose, 17 h 20 V, 4°C)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix").

2.2.2 HindIII-, EcoRI/HindIII- und XhoI/HindIII-Verdauungen

HindIII schneidet bei K.pneumoniae die gesamte nif-Region, lokalisiert auf zwei benachbarten Fragmenten (insgesamt ca. 24 kb (50)), aus dem Genom heraus (vgl. Abb.3). Aus diesem Grund wurden bei R.meliloti Spaltungen mit HindIII durchgeführt, um zu untersuchen, ob auch hier wie bei Klebsiella die ganze nif-Region auf wenigen Fragmenten von der Gesamt-DNA abgetrennt werden kann.

Hybridisierungen HindIII-verdauter Gesamt-DNA mit ^{32}P-pWK27-DNA (Abb.8) führten bei R.meliloti aber je nach Stamm zu 2 - 3 weit kleineren Fragmenten als bei K.pneumoniae. Diese Ergebnisse ermöglichten die Einteilung der verwendeten Stämme in 3 Gruppen. Gruppe I (E2, E4, E5, E6, 20-1 und L5-30) zeigte ein Hybridfragment bei 2,1 kb, Gruppe II (MVII/1, E1, E3, E7, E8, E9, E10 und E11) ein deutliches Fragment bei 7 kb. Das 2,1 kb-Fragment der Gruppe I war hier nur dünn oder gar nicht zu beobachten. E12 war der einzige Vertreter in Gruppe III mit einem Fragment bei 1,2 kb. Bei allen Gruppen trat ein gemeinsames Fragment von 3,5 kb auf. R.leguminosarum 300 hybridisierte bei 3,3 und 2,75 kb.

Die gleiche Aufspaltung der R.meliloti-Stämme in Untergruppen ergab sich bei Hybridisierungen mit EcoRI/HindIII-doppelverdauter DNA (Abb.9). Gruppe I hatte eine Hybridbande bei 2,2 kb, Gruppe II bei 2,9 kb, beiden gemeinsam war eine Bande bei 1,2 kb. Bei E12 wurde nur eine, aber auffallend kräftige Bande bei 1,3 kb gefunden, bei R.leguminosarum 300 jedoch Banden von 1,35 und 1,15 kb. Bei diesen EcoRI+HindIII-Spaltungen trat immer wieder eine Anzahl dünner Banden zwischen den beiden kräftigen auf, die möglicherweise auf eine unspezifische Aktivität der eingesetzten Enzyme unter den Bedingungen dieser Doppelverdauung zurückzuführen sind.

XhoI/HindIII- Doppelverdauungen (Abb.10) führten dagegen mit Ausnahme von E12 bei R.meliloti wieder zu einheitlichen Hybridfragmenten von 3,7, 2,2 und 0,9 kb (bei E7 reines HindIII-Hybridisierungsmuster wegen der fehlenden XhoI-Spaltbarkeit!) E12 zeigte starke Hybridisierung bei 2,9 kb, erheblich schwächere Hybridisierung bei 2,2, 0,9 und 0,8 kb (vgl. auch Abb.17).
Für R.leguminosarum 300 ergaben sich Werte von 2,6 und 2,1 kb.

3.3.3 BamHI- und BamHI/XhoI-Verdauungen

Bei BamHI-Verdauungen von R.meliloti-Gesamt-DNA (Abb.11) und Hybridisierung mit ^{32}P-pWK27-DNA wurden sehr lange Hybridfragmente von 15 kb nachgewiesen, bei E12 nur von 11 kb. Die kräftigste radioaktive Bande bei R.leguminosarum 300 hatte eine Länge von 20 kb. Auch bei BamHI-Spaltungen trat zusätzlich öfter eine Reihe dünnerer Banden unter 15 kb-Bande auf.

Durch BamHI/XhoI-Doppelverdauungen (Abb.12) wurde das große BamHI-Hybrid-Fragment bei R.meliloti auf 7 kb verkürzt (E7 nur BamHI-gespalten!) Nur bei E12 bildeten sich 2 Hybridfragmente mit 5,5 und 1,6 kb.

3.3.4 EcoRI/BamHI- und HindIII/BamHI-Verdauungen

EcoRI/BamHI- und HindIII/BamHI-Doppelverdauungen sind in Abb.13 bei einer Auswahl von R.meliloti-Stämmen jeder Gruppe (E4, 20-1 und L5-30 aus Gruppe I, E1 und MVII/1 aus Gruppe II sowie E12) dargestellt.
Die zusätzliche BamHI-Verdauung lieferte in keinem Fall mehr Informationen als die EcoRI- und HindIII-Einzelverdauung.

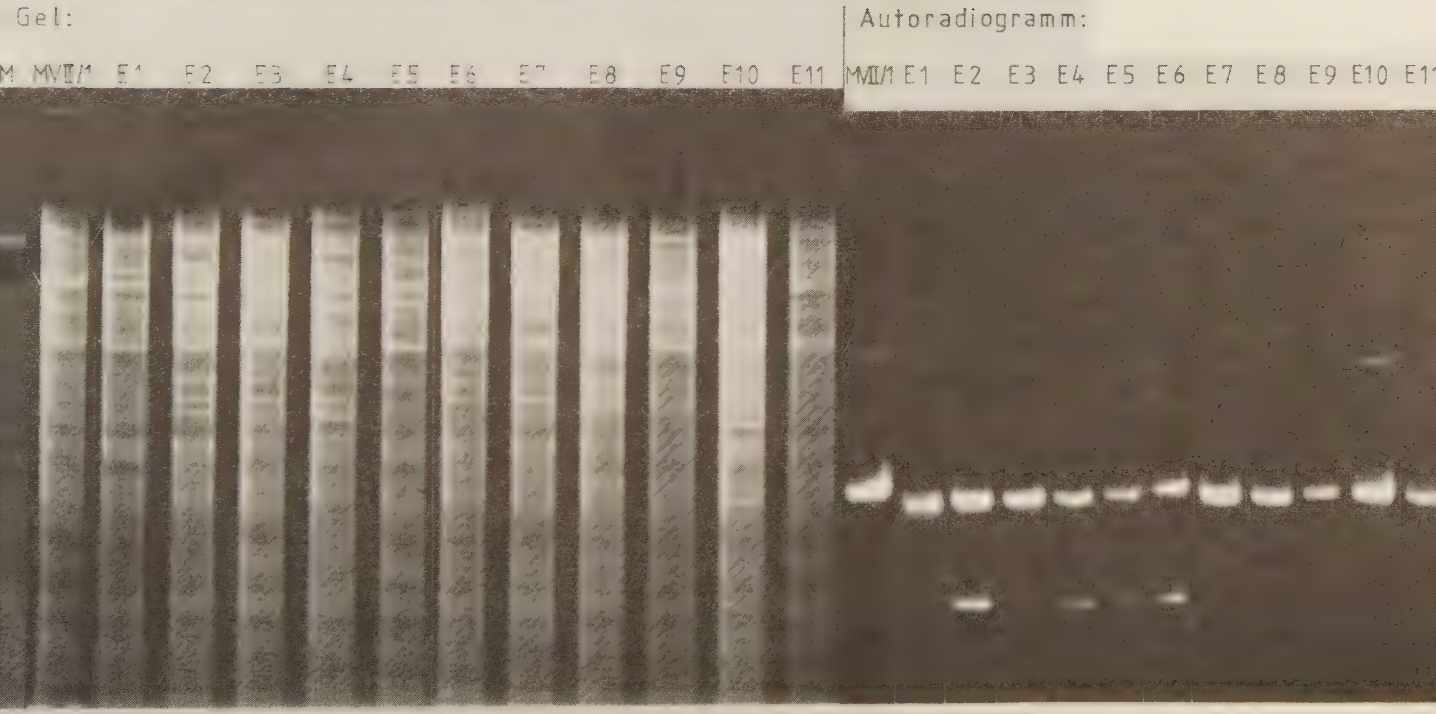

Gel:
Autoradiogramm:
M MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11
MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11

Abb.8a

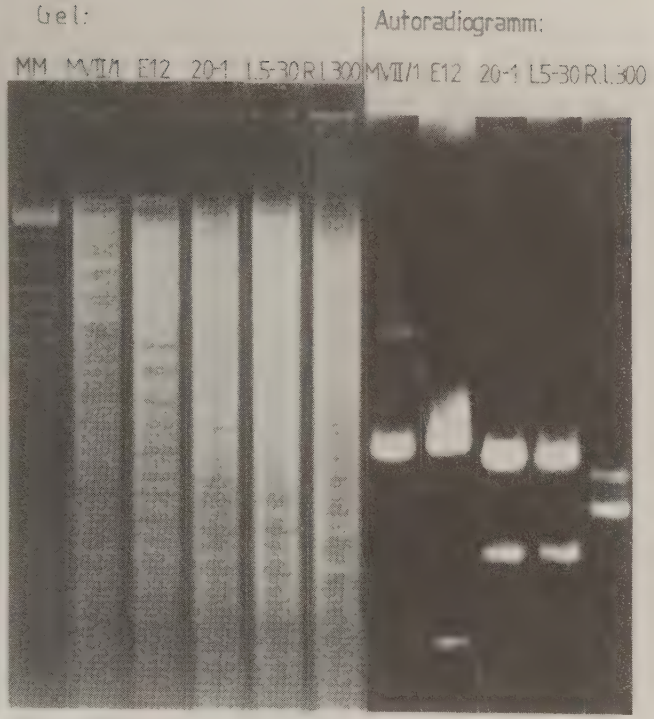


Abb.8b

Abb.8:
Gel-Elektrophorese HindIII-verdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E11 (0,7 % Agarose, 17 h 25 V, 4°C)
b) R.meliloti MVII/1, E12, 20-1 und L5-30 und R.leguminosarum 300 (0,7 % Agarose, 16 h 25 V, 4°C)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix").

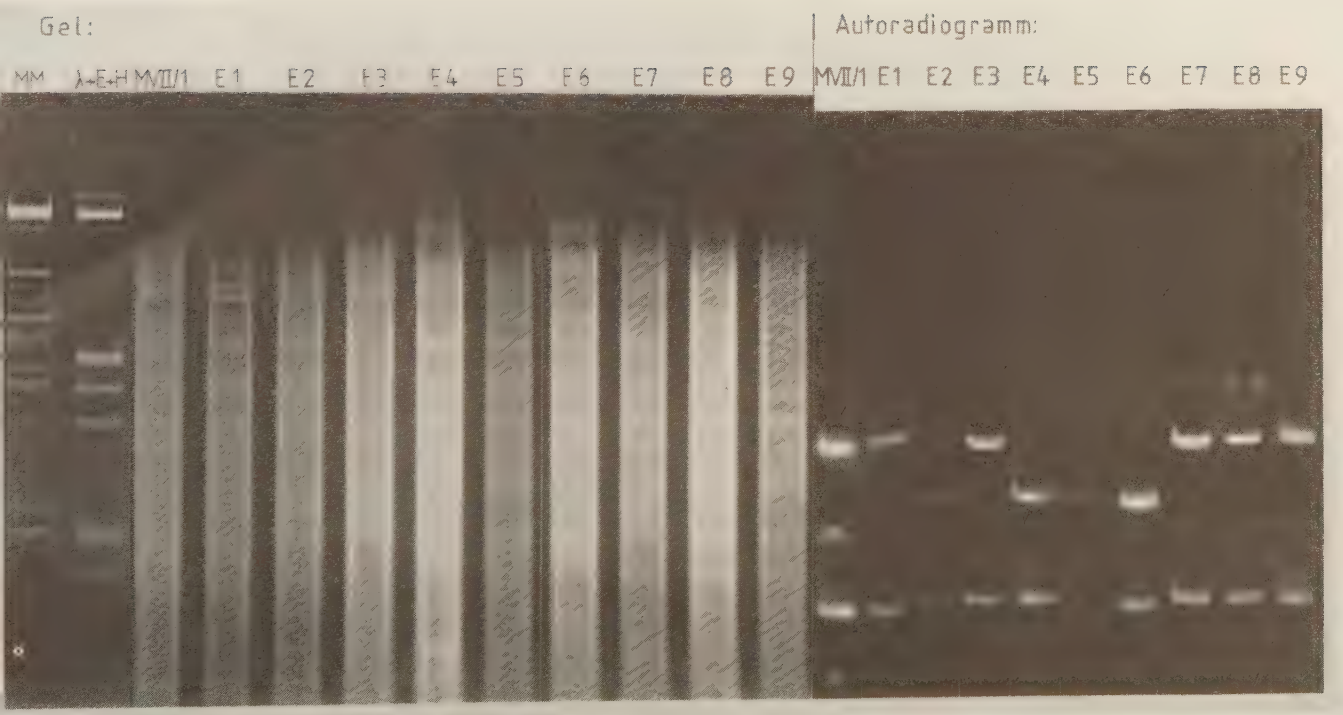

Gel:
MM
λ+E+H
MVII/1
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
Autoradiogramm:
MVII/1
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9

Abb.9a

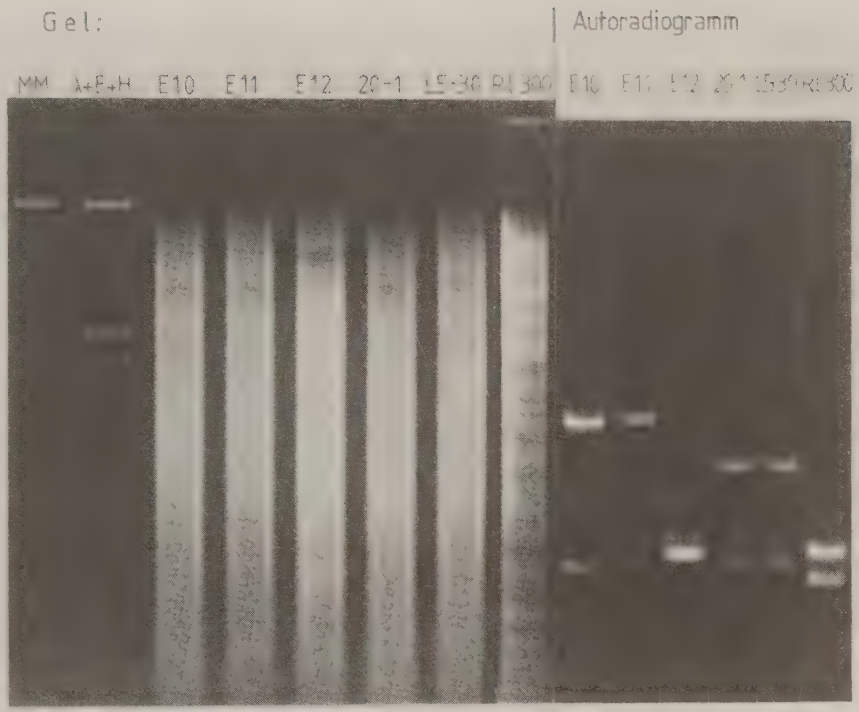
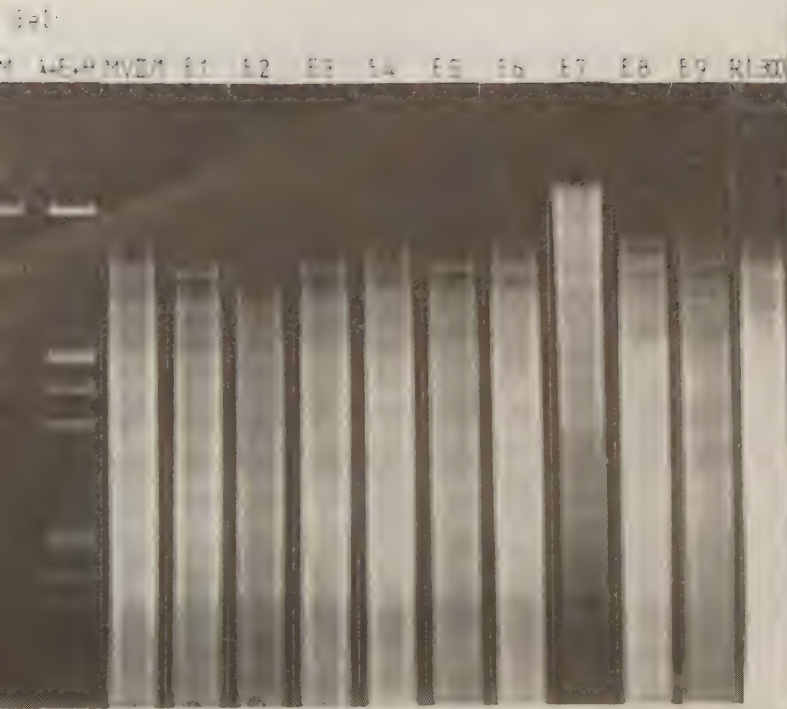


Abb.9b

Abb.9:
Gel-Elektrophorese EcoRI/HindIII-doppelverdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E9
b) R.meliloti E10, E11, E12, 20-1 und L5-30 und R.leguminosarum 300
(jeweils 0,8 % Agarose, 14 1/2 h 25 V, 4°C)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix" und λ + EH = λ-DNA verdaut mit EcoRI + HindIII als Längenstandards).


E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9

Autoradiogramm
E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9

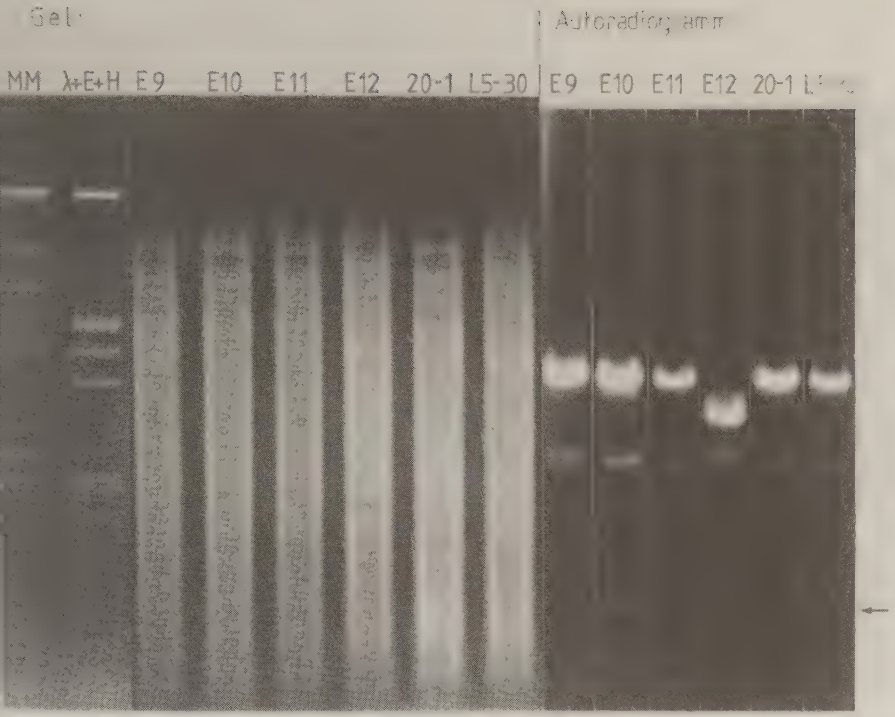


Abb.10:
Gel-Elektrophorese XmoI/HindIII-doppelverdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E9 und R.leguminosarum 300 (0,8 % Agarose, 15 1/2 h 25 V, 4°C)
b) R.meliloti E9 - E12, 20-1 und L5-30 (0,8 % Agarose, 14 1/2 h 25 V, 4°C)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix", λ + EH = λ-DNA + EcoRI + HindIII).

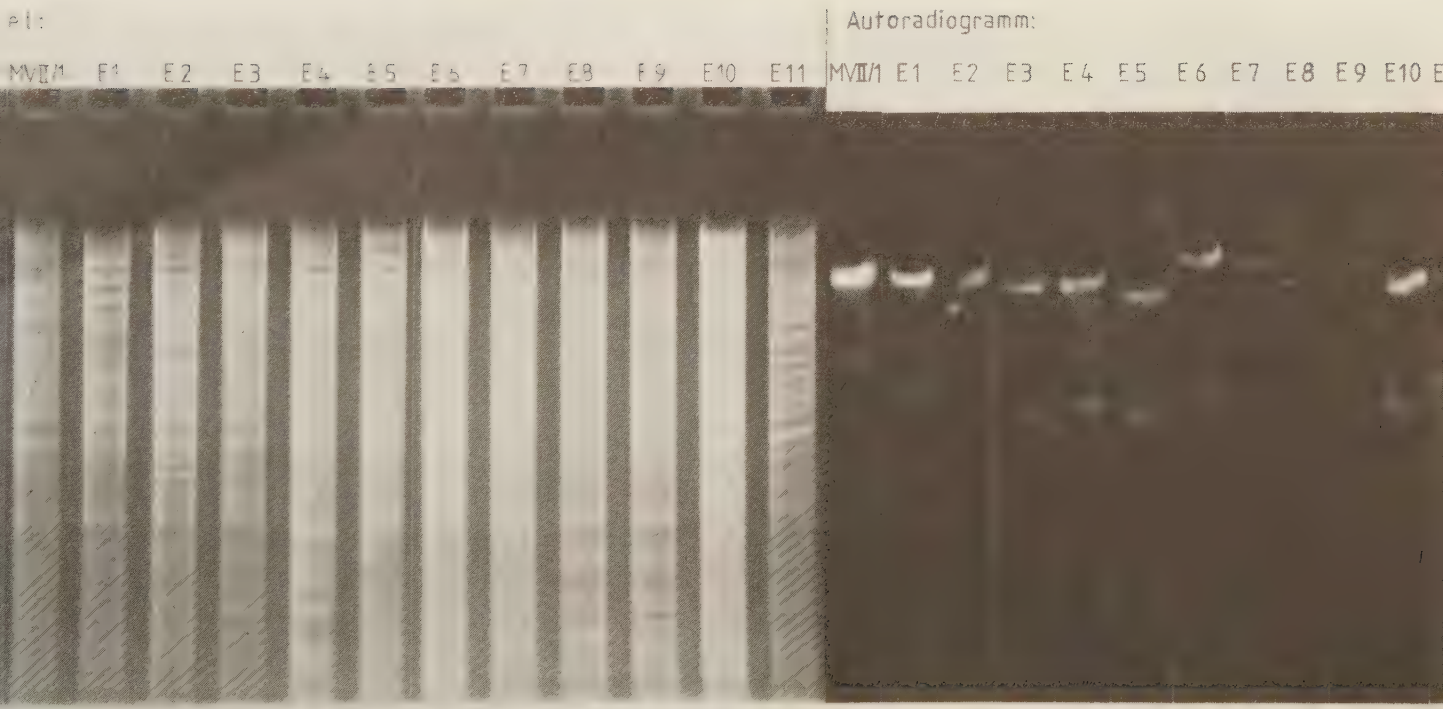

el:
MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11
Autoradiogramm:
MVII/1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E

Abb.101

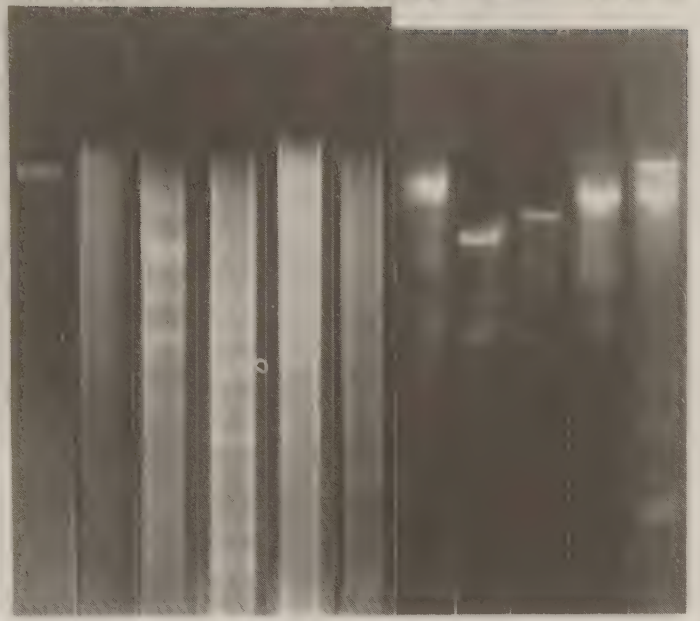
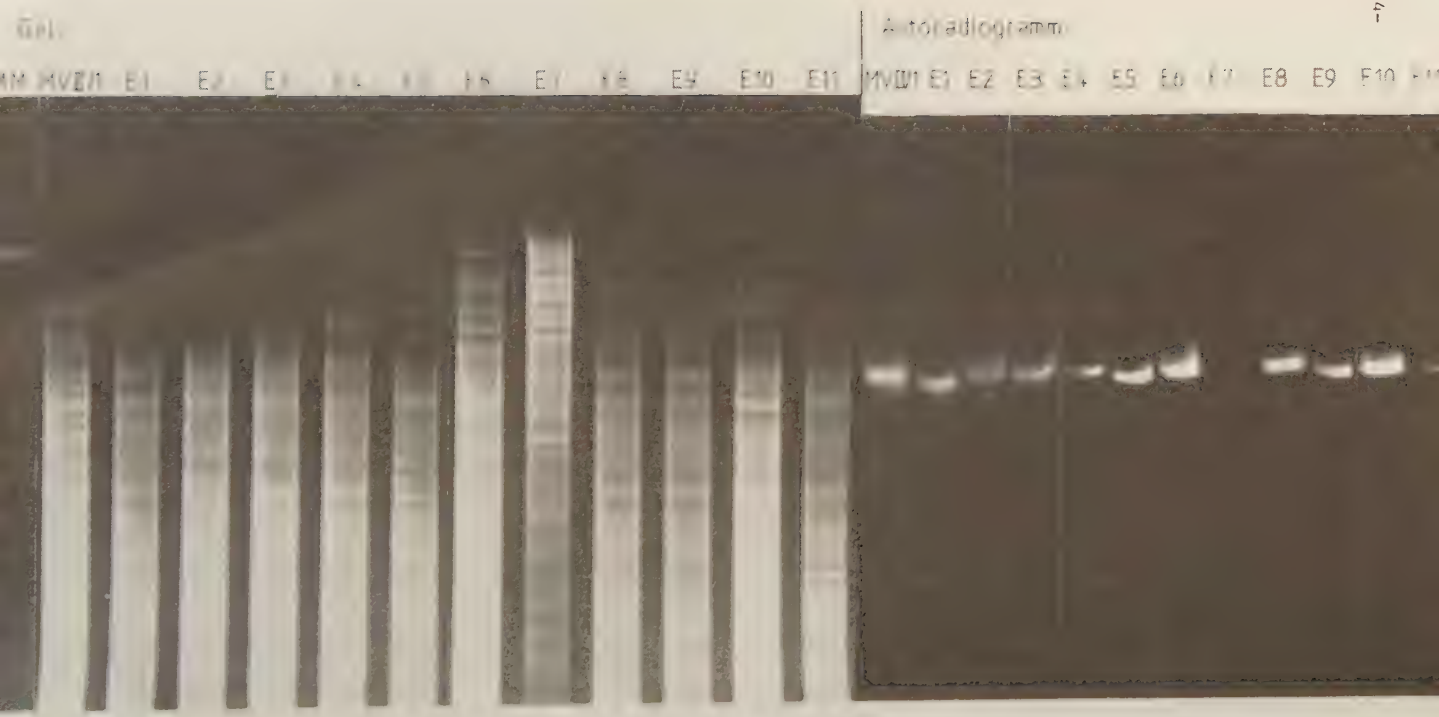


Abb.11:
Gel-Elektrophorese BamHI-verdauter
Gesamt-DN[illegible]
a) R.meliloti MvII/1 und E1 - E11
b) R.meliloti MvII/1, E12, 20-1 und
L5-30 und R.leguminosarum [illegible]
(jeweils 0,7 % Agarose, 18 h
25 V, [illegible]°C)
und Autoradiogramme [illegible]
Hybridisierung (C.S.[illegible] mit [illegible]-
[illegible]
([illegible] = "Marker-Mix").


Gel
Autoradiogramm
MVØ1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11
MVØ1 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10

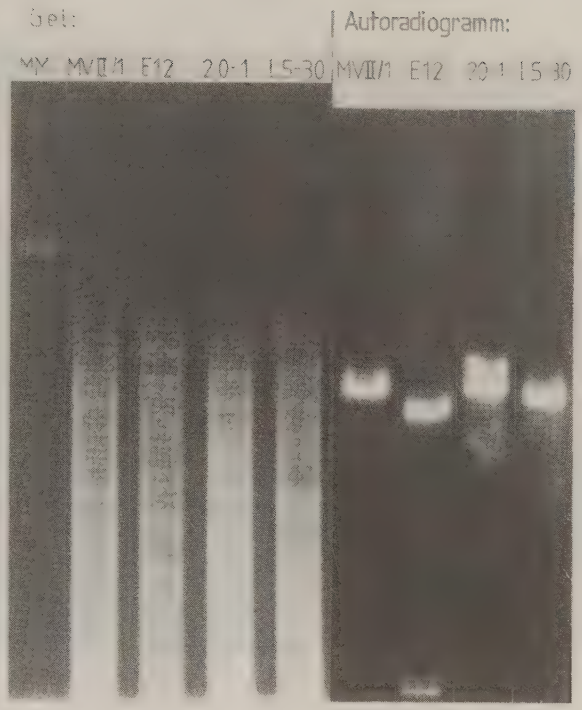


Abb.12:
Gel-Elektrophorese BamHI/XhoI-doppelverdauter Gesamt-DNA
a) R.meliloti MVII/1 und E1 - E11,
b) R.meliloti MVII/1, E12, 20-1 und L5-30
(jeweils 0,7 % Agarose, 18 h 25 V, $4^{o}C$)
und Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA.
(MM = "Marker-Mix").

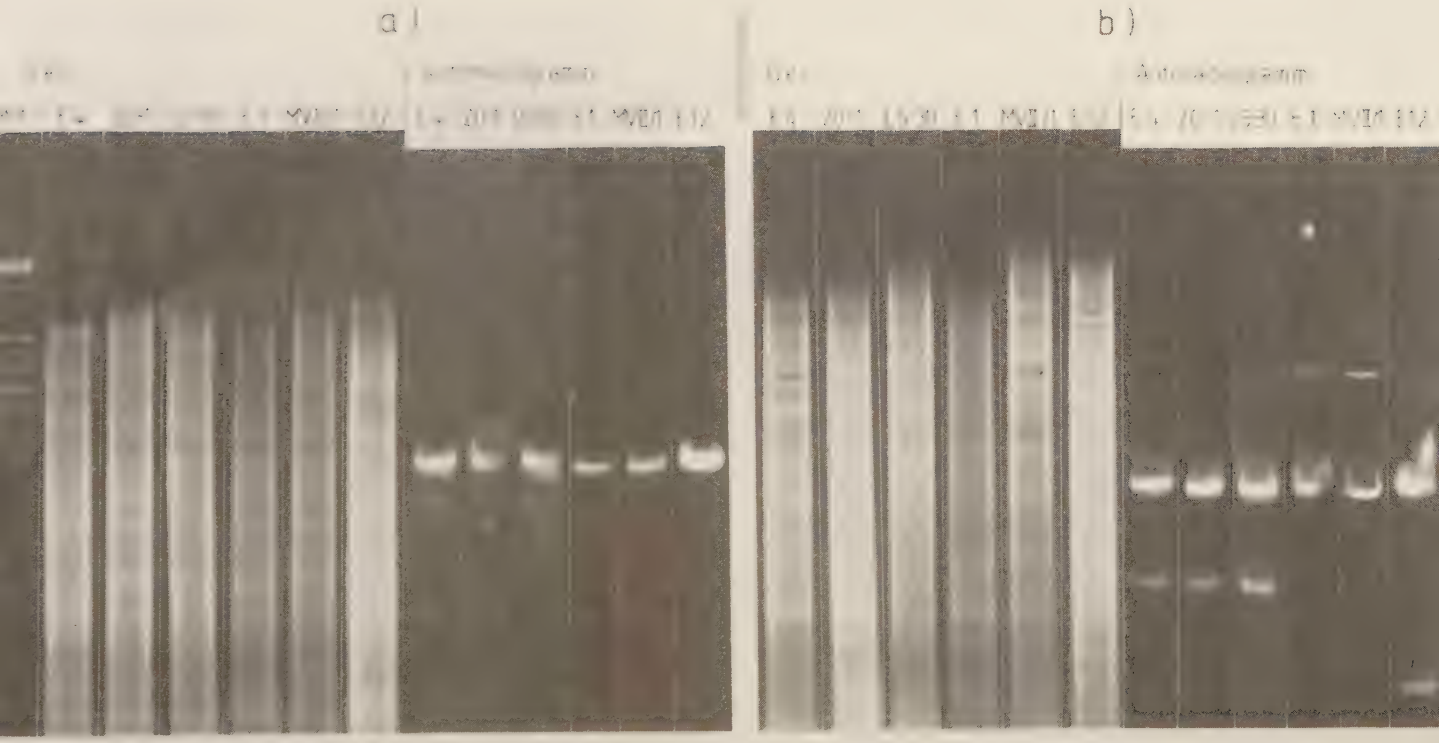


Abb.13: Auftrennung EcoRI/BamHI- (a) und HindIII/BamHI- (b) doppelverdauter Gesamt-DNA von R.meliloti E4, 2L-1, L5-30, E1, YJII/1 und E12 in einem 0,7%igen Agarose-Gel (16h 25V, 4°C) und Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA. (MM = "Marker-Mix").

2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die kb-Mittelwerte der Hybridfragmente wurden anhand mehrerer Agarose-Gele jeder Verdauung berechnet und in Tab.2 nach Gruppen zusammengefaßt.
Am eindeutigsten waren die Spaltungen bei den Restriktionsenzymen EcoRI, XhoI und BamHI bei den Gruppen I und II. Das hybridisierende 4 kb-EcoRI-Fragment ist nicht als ganzes im XhoI-Fragment enthalten, sondern überlappt nur auf einer Länge von 2 kb, wie die EcoRI/XhoI-Doppelverdauung zeigt. Da kein weiteres hybridisierendes EcoRI/XhoI-Fragment auftritt, handelt es sich hier um das zu K.pneumoniae nif YKDH homologe Kernstück ("nif-core") des R.meliloti-Genoms. Das BamHI-Hybrid-Fragment dagegen überspannt vollständig das EcoRI-Fragment und damit das enthaltene "nif-core", wie die EcoRI/BamHI-Spaltung bestätigt.

izobium meliloti-Fragmente, die mit den Klebsiella pneu-
niae M5a1-Genen nif YKOH in pWK27 hybridisieren
ittelwerte in kb; kräftige Banden im Autoradiogramm sind
terstrichen).

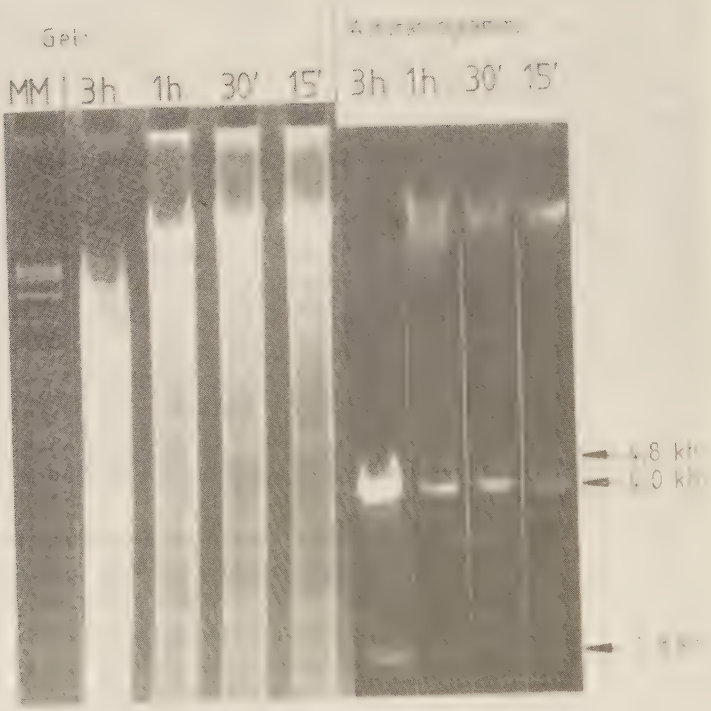
ons-	Gruppe I: E2,E4,E5,E6, 20-1 und L5-30	Gruppe II: MVII/1,E1,E3,E7, E8,E9,E10 und E11	Gruppe III: E12
	4,13 1,87	4,13 1,87	4,23 2,18
I	2,06	2,06	2,29 2,14 1,62 0,78
	18,58 (bei E2 und E6: 9,0)	18,58 (E7: keine XhoI-Schnittstellen)	6,4 3,95 1,54 0,78
	3,52 2,15	7,02 3,52 2,19	3,65 1,23
dIII	2,22 1,22	2,93 1,22	1,86 1,25
III	3,76 2,25 0,93	3,76 2,25 0,93	2,82 2,26 0,89 0,78
	15,42	15,42	10,5
oI	7,13	7,13	5,5 1,65 0,76
mHI	4,12 3,42 1,84	4,12 3,42 1,84	4,2 3,35 2,26
BamHI	3,59 2,18	7,03 3,59 2,2	3,6 1,15

3. Weitere Aufklärung der Restriktionsanalysen von R.meliloti-"nif-DNA"

Mit den Versuchen in D.2 konnte nicht entschieden werden, ob in den Autoradiogrammen die dünnen Banden durch Hybridisierung der n i f-Region oder beliebiger Genbereiche im R.meliloti-Genom mit pWK27-DNA zustande kamen.
Ungeklärt blieb weiterhin die Tatsache, daß bei Gruppe II (vgl. Tab.2) drei HindIII-Fragmente auftauchten im Gegensatz zu zweien bei Gruppe I.
Schließlich blieb die Diskrepanz der fast immer völlig anderen kb-Werte und zahlreichen dünneren Hybridbanden bei R.meliloti E12. Sein von den anderen Stämmen abweichendes Restriktionsfragmentmuster im Agarosegel ließ auch auf eine anders aufgebaute nif-Region schließen.
Die folgenden Versuche sollten zur Klärung dieser Fragen beitragen.

3.1 Bedeutung der dünnen Banden bei Hybridisierung von EcoRI-verdauter R.meliloti-DNA mit pWK27-DNA

Über unvollständige Spaltungen sollte nachgewiesen werden, ob nur die kräftigen Banden im Autoradiogramm oder auch die dünnen Banden zur R.meliloti-nif-Region gehören, z.B. als hybridisierende Randbereiche. Letzteres wäre der Fall, wenn bei partieller Verdauung Hybridfragmente mit der Länge einer dicken + einer dünnen Bande entstehen würden, also das schwach hybridisierende Fragment im Genom unmittelbar neben dem stark hybridisierenden läge.
Nur die unvollständige EcoRI-Verdauung lieferte eine sinnvolle Aussage. Wie aus Abb.14 zu entnehmen ist, entstand kein 5,8 kb langes Hybridfragment, das aus der kräftigen 4 kb-EcoRI-Bande und der schwachen 1,8 kb-Bande zusammengesetzt wäre, sondern nur ein Fragment von 4,8 kb. Demnach ist das 1,8 kb-Fragment nicht in nächster Nähe des R.meliloti-"nif-cores" lokalisiert und steht mit der nif-Region nicht unbedingt in Zusammenhang.



.14: Gel-Elektrophorese partiell verdauter S.meliloti MVII/1-Gesamt-DNA mit EcoRI (3h, 1h, 30 min und 15 min) (0,7 % Agarose, 16 h 25 V, 4°C) und Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA. (MM = "Marker-Mix").

D.3 Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pRmR2-DNA

Klarheit über die in manchen Verdauungen auftretenden dünnen oder in den einzelnen Gruppen unterschiedlichen Hybridbanden sollte das Plasmid pRmR2 (52) schaffen.
In pRmR2 (Abb.15) ist das 4 kb-EcoRI-Fragment aus R.meliloti 2011 kloniert, das mit den K.pneumoniae-Genen nif YKDH in pWK27 hybridisiert. Die Längenangaben (in kb) wurden aus Agarose-Gelen anhand von Längenstandards (C.4.3) berechnet (vgl. Abb. 19).

Diesen Versuchen lag folgende Überlegung zugrunde:
Da pRmR2 das mit pWK27 hybridisierende R.meliloti-"nif-core" (vgl. D.2.3) bei gleichem Träger-Plasmid enthält, müssen bei Southern-Hybridisierung (C.5.2) von R.meliloti-Gesamt-DNA, die mit den verwendeten Restriktionsenzymen verdaut worden ist, auf jeden Fall die gleichen Hybridfragmente erscheinen wie bei Hybridisierung mit pWK27. Weil es sich aber um eine Hybridisierung von R. m e l i l o t i-nif-DNA mit R.meliloti-Gesamt-DNA handelt, wird sie zum einen viel stärker ausfallen, zum anderen werden nur echte R.meliloti-nif-Fragmente hybridisieren und Banden, die in D.2 durch nif-unspezifische Hybridisierung des K.pneumoniae-DNA-Anteils in pWK27 mit R.meliloti-DNA zustande kamen, wegfallen.
Das R.meliloti-4kb-Fragment in pRmR2 enthält aber außer dem "nif-core" noch weitere 2000 Basenpaare, so daß bei einigen Verdauungen, wo Restriktionsschnitte in diesem 2 kb-DNA-Bereich liegen (vgl. Abb.15), noch zusätzliche Hybrid-Fragmente zu erwarten sind.

Für eine Auswahl von R.meliloti-Stämmen jeder Gruppe (vgl. Tab.2) ist das Ergebnis in Abb.16 dargestellt. Gesamt-DNA von L5-30 und E4 aus Gruppe I, MVII/1 und E1 aus Gruppe II und E12 (Gruppe III) wurde HindIII- (Abb.16a), EcoRI/HindIII- (Abb.16b) und XhoI/HindIII-gespalten (Abb.16c), im 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, nach Southern auf NC-Filter transferiert und mit ^{32}P-markierter pRmR2-DNA hybridisiert (C.5). Abb.16d zeigt das gleiche für weitere Spaltungen von E12-DNA mit EcoRI, EcoRI/XhoI, XhoI, BamHI und BamHI/XhoI.

Die Hybridisierung zwischen R.meliloti- und pRmR2-DNA fiel so stark aus, daß wenige Stunden Belichtungszeit bei der Autoradiographie genügten, um die Haupt-Hybridbanden klar zu erkennen (Abb.16).
Bei der Auswertung wurden die Längen der dicksten Hybridbanden berechnet (C.4.3) und mit den Mittelwerten der pWK27-Hybridfragmente

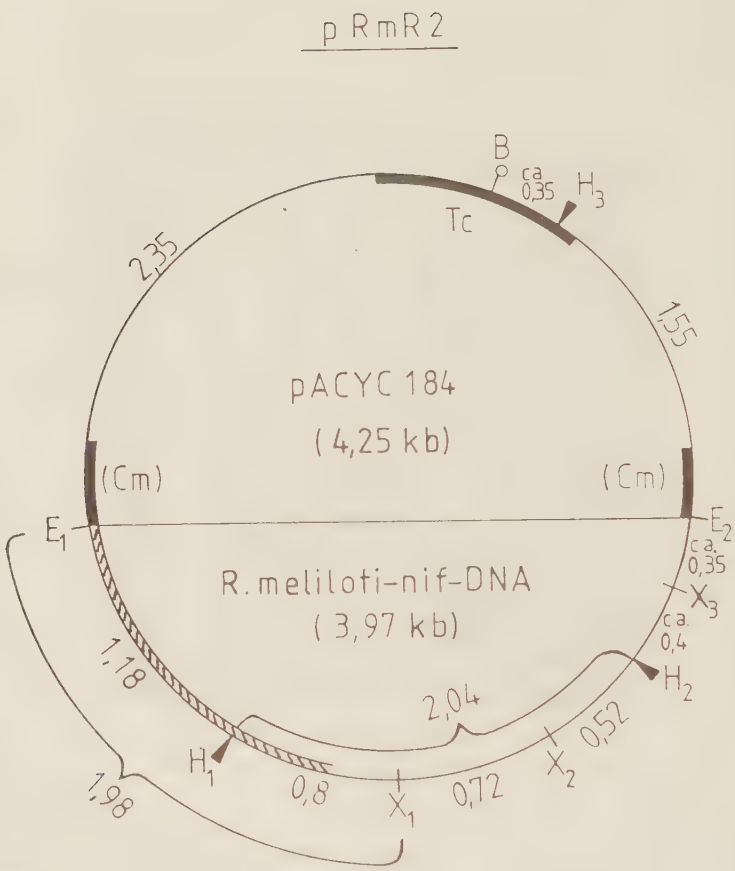
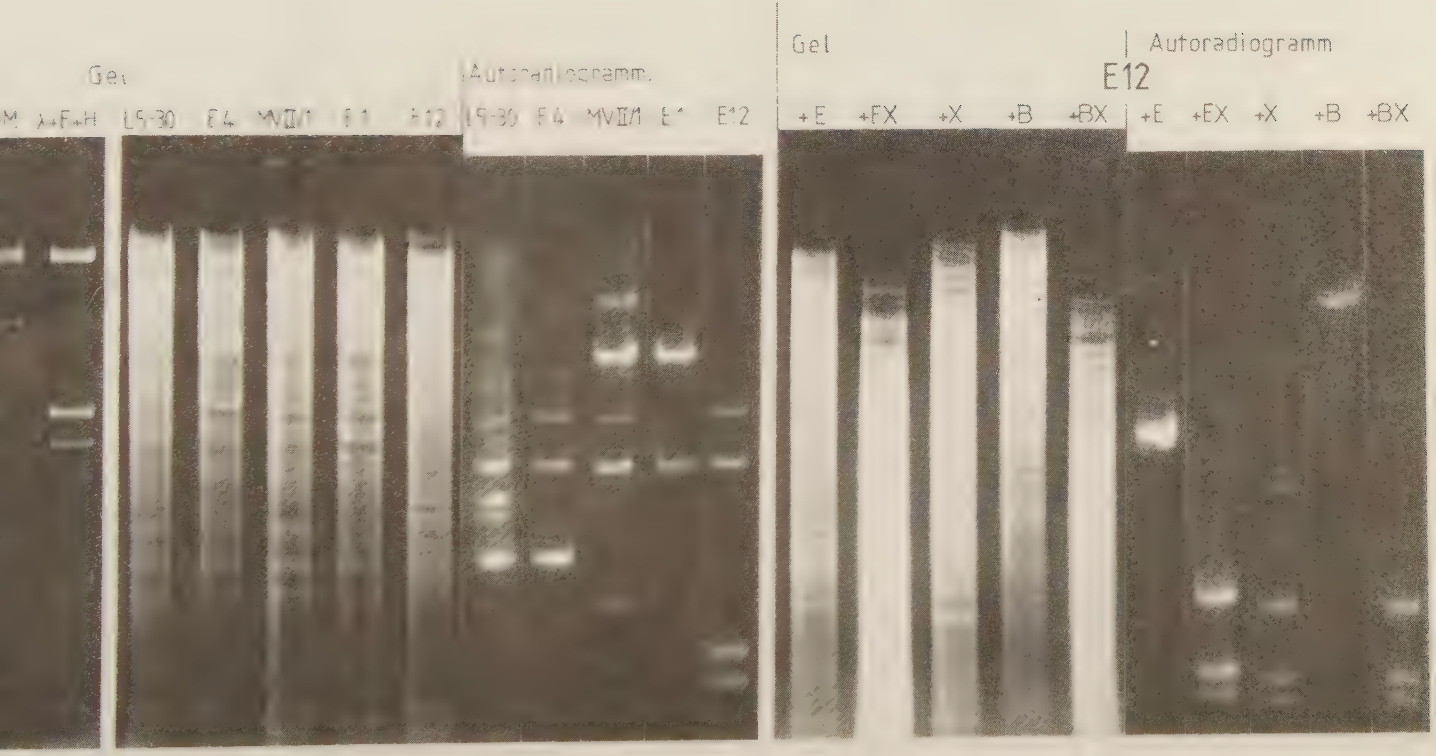


Abb.15: Hybrid-Plasmid pRmR2 aus dem Trägerplasmid pACYC184 und dem EcoRI-Fragment von R.meliloti 2011, das den zur Klebsiella pneumoniae-nif-Region homologen DNA-Abschnitt enthält (52).
(Längenangaben in kb;
E = EcoRI, H = HindIII, X = XhoI, B = BamHI;
Durchnummerierung der Restriktionsschnitte im Gegenuhrzeigersinn).

aus Tab.2 verglichen (Tab.3).
Die R.meliloti-pWK27-Hybridbanden werden bis auf einige dünne Banden in der pRmR2-Spalte von Tab.3 mit großer Übereinstimmung wiedergefunden. Im wesentlichen entsprechen sie den stärksten Hybridbanden mit pRmR2-DNA.
Durch das Herausfallen einiger schwacher Banden des Hybridisierungsergebnisses mit pWK27 (in Tab.3 mit ← gekennzeichnet), bei denen es sich offensichtlich nur um zufällige Basenpaarung von Klebsiella- mit R.meliloti-DNA handelt, vereinfacht sich einerseits die Wertetabelle 2, andererseits wird die Unterteilung der untersuchten R.meliloti-Stämme in die Gruppen I, II und III bestätigt.

Neben den nif-spezifischen Banden bei Hybridisierung mit pRmR2-DNA trat noch eine mehr oder weniger große Anzahl zusätzlicher Banden auf. Nur in wenigen Fällen finden sich Fragmente ähnlicher Länge im Bereich X_1E_2 von pRmR2 (Abb.15) unter den neu erscheinenden Hybrid-Fragmenten in Tab.3 wieder.


Gel
Autoradiogramm
M λ+F+H L9-30 E4 MVIII/1 E1 E12
L9-30 E4 MVIII/1 E1 E12
Gel
Autoradiogramm
E12
+E +FX +X +B +BX
+E +EX +X +B +BX

a) d)

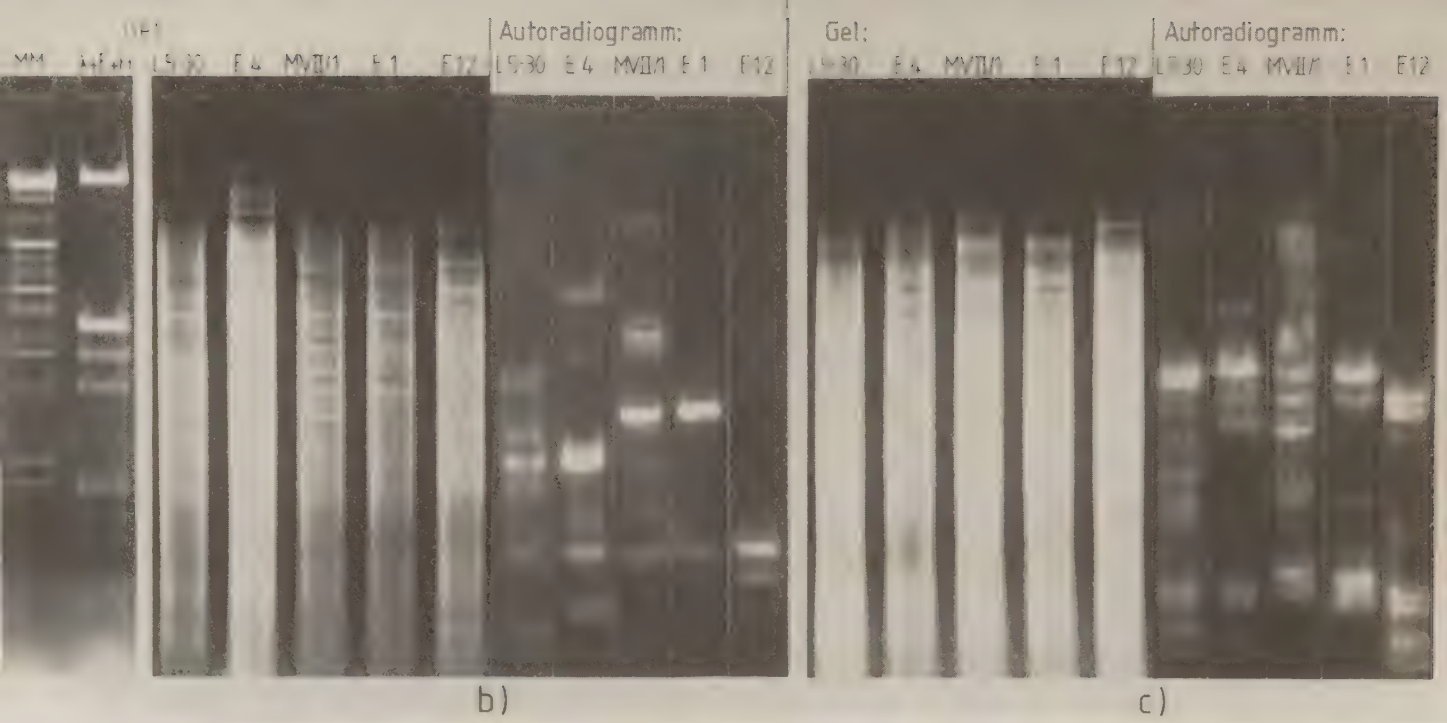


Abb.16: Gel-Elektrophorese (0,7 % Agarose, 17 h 20 V, 4°C)
a) HindIII-verdauter
b) EcoRI/HindIII-doppelverdauter
c) XhoI/HindIII-doppelverdauter
Gesamt-DNA von R.meliloti L5-30, E4, MVII/1, E1 und E12
d) mit verschiedenen Restriktionsenzymen einfach- oder doppelverdauter R.meliloti E12-Gesamt-DNA (E = EcoRI, X = XhoI, B = BamHI)
und Autoradiogramme (nur 7 1/2 h Belichtung!) nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pRmR2-DNA. (MM = "Marker-Mix", λ + EH = λ-DNA + EcoRI + HindIII).

Tab.3: Vergleich der R.meliloti-Hybridfragmente (kb) nach Hybridisierung mit pRmR2-DNA
a) bei HindIII-, b) EcoRI/HindIII- und c) XhoI/HindIII-verdauter Gesamt-DNA von R.meliloti L5-30, E4, MVII/1, E1 und E12 und
d) bei EcoRI-, EcoRI/XhoI-, XhoI-, BamHI- und BamHI/XhoI-gespaltener E12-DNA.
(Die kräftigsten Hybridbanden mit pRmR2 sind unterstrichen).

a) HindIII:

Stamm	Hybridisierung mit pRmR2	Hybridisierung mit pWK27
L5-30	8,6	
	6,0	
I	4,65	
	3,65	3,52
	3,0	
	2,75	
	2,1	2,15
E4	6,2	
I	4,9	
	3,65	3,52
	2,15	2,15
MVII/1	11	
	7,0	7,02
II	4,7	
	3,5	3,52
		2,19 ←
	1,65	
E1	7,0	7,02
II	3,45	3,52
		2,19 ←
E12	4,9	
III	3,6	3,65
	1,25	1,23
	1,02	

b) EcoRI/HindIII:

Stamm	Hybridisierung mit pRmR2	Hybridisierung mit pWK27
L5-30	3,6	
	2,65	
I	2,2	2,22
	1,9	
	1,2	1,22
	0,62	
E4	6,3	
	2,4	
	2,2	2,22
	1,22	1,22
	0,8	
MVII/1	4,9	
	4,4	
II	3,0	2,93
	1,2	1,22
E1	3,0	2,93
II	1,25	1,22
E12		1,86 ←
III	1,27	1,25
	1,05	

c) XhoI/BinaIII:

Stamm	Hybridisierung mit pRmR2	Hybridisierung mit pWK27
E5-3[illegible]	3,75	3,76
	2,5	
I		2,25 ←
	2,05	
	1,75	
	ca. 0,9	0,9[illegible]
	0,67	
	ca. 0,48	
E4	3,9	3,76
	3,3	
I	2,85	
		2,25 ←
	ca. 0,9	0,93
	0,6	
MVII/1	10,3	
	8,7	
II	ca. 4,9	
	3,85	3,76
	3,25	
	2,7	
		2,25 ←
	1,12	
	0,94	0,93
E1	3,8	3,76
II	3,1	
		2,25 ←
	1,0	0,93
	ca. 0,86	
E12	3,25	
	3,0	2,92
III		2,25 ←
	0,9	0,89
	0,8	0,78
	0,56	
	<0,4	

d) R.meliloti E12 (III):

Restriktions-enzym(e)	Hybridisierung mit pRmR2	Hybridisierung mit pWK27
EcoRI	4,2	4,23
		2,18 ←
EcoRI +		2,29 ←
XhoI		2,14 ←
	1,68	1,62
	1,03	
	0,84	0,78
XhoI	6,3	6,4
		3,95 ←
	3,0	
	1,57	1,54
	0,97	
	0,82	0,78
BamHI	10,2	10,5
BamHI +	5,15	5,5
XhoI	1,57	1,65
	0,97	
	0,82	0,76

3.3 Suche nach kleinen DNA-Fragmenten von R.meliloti E12, die mit pWK27 hybridisieren

Die größten Schwierigkeiten bei der Aufstellung einer Restriktionskarte der nif-Region von R.meliloti E12 bereiteten die Verdauungen dieser DNA, die mehr oder weniger Hybridbanden im Vergleich zu denen der Gruppe I oder II bildeten (vgl. Tab.3): nur 1 Hybridbande mit EcoRI/HindIII, dafür 2 EcoRI/XhoI-, 3 XhoI-, 3 XhoI/HindIII- und 3 BamHI/XhoI-Hybridbanden. Auffällig war das den XhoI-, EcoRI/XhoI- und BamHI/XhoI-Verdauungen gemeinsame 1,6 kb-Fragment. Bei dem relativ schwachen 0,8 kb-Hybridfragment bei EcoRI/XhoI, XhoI- und BamHI/XhoI-Verdauungen war eine geringfügige Hybridisierung am Rande des "nif-cores" nicht auszuschließen.
Da bei reiner EcoRI-Verdauung bei allen untersuchten R.meliloti-Stämmen Hybridisierung mit pWK27 in gleicher Stärke auftritt, sollte überall der "nif-core"-Bereich etwa gleich groß sein. Als Ursache für das unterschiedliche Restriktionsverhalten von R.meliloti E12 war mindestens eine weitere Restriktionsstelle für XhoI denkbar.

Mit konzentrierten Gelen (1 - 3 % Agarose) wurde daher nach Hybridfragmenten kleiner 0,8 kb gesucht, um vor allem im Fall von EcoRI/XhoI- und EcoRI/HindIII-Spaltungen kräftig hybridisierende DNA-Bereiche mit ca. 2 kb Gesamtlänge wie bei Gruppe I und II zu finden.
Hochprozentige Agarose trennt nicht nur im Bereich um 1 kb besser auf, sondern verhindert auch beim Southern-Transfer, daß die kleinen Fragmente durch die Denaturierungs- und Neutralisierungslösung allzusehr herausgeschwemmt werden und somit von vorneherein für die Hybridisierung verloren gehen. Dafür sind jedoch lange Hybridfragmente unterrepräsentiert, weil sie aus dem dicken Gel kaum herausgesaugt werden können.
Aus Abb.17 geht hervor, daß nur eine ganz dünne EcoRI/XhoI-Hybridbande mit den fehlenden ca. 0,4 kb vorkommt und daß es sich bei dem hybridisierenden EcoRI/HindIII-Fragment um eine Doppelbande handeln muß, denn bei HindIII-Verdauung allein taucht diese Bande - dünner - auch schon auf. Bei der XhoI/HindIII-Spaltung treten hier die 0,9- und 0,8 kb-Hybridbanden deutlich in Erscheinung, wobei das 0,8 kb-Fragment etwas kräftiger ist (Abb.17A). Es könnte also größeren Anteil am "nif-core" haben.

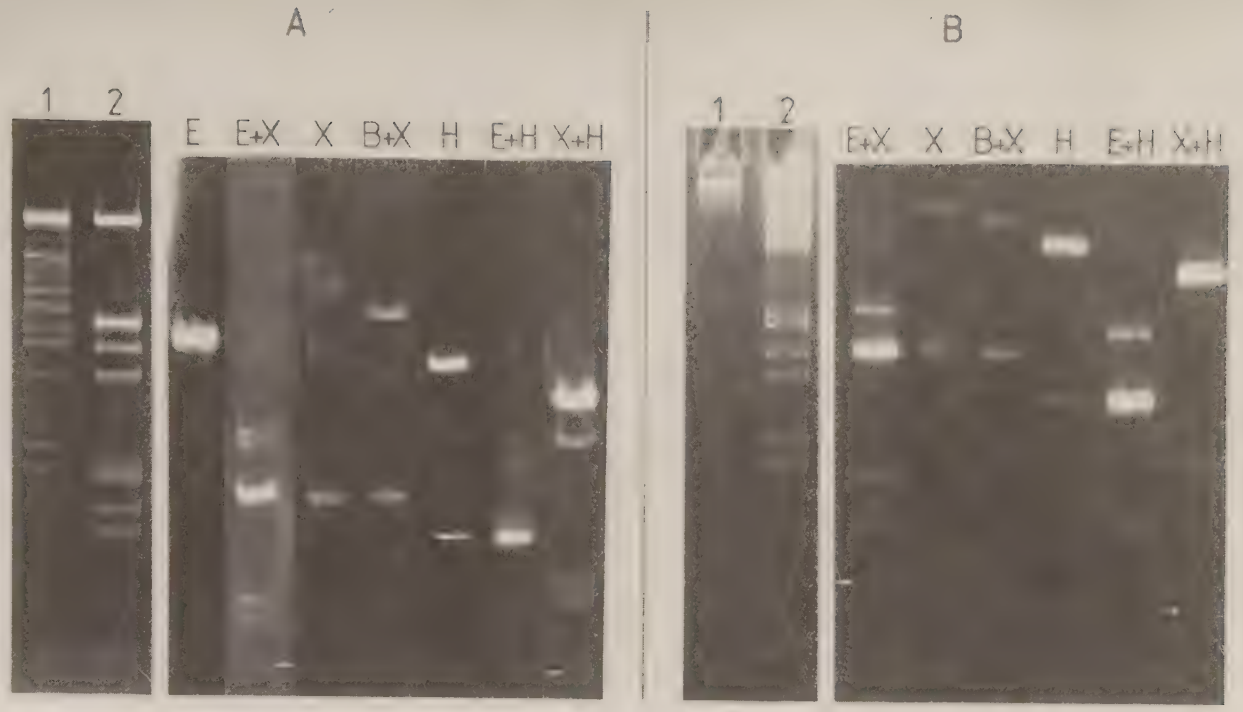


Abb.17: Autoradiogramme einfach- und doppelverdauter R.meliloti E12-Gesamt-DNA, die durch Gel-Elektrophorese
A) 1 % Agarose, 14 h 25 V, 4°C
B) 2,5 % Agarose, 14 h 25 V, 4°C
aufgetrennt und nach Southern (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA hybridisiert worden war.
Restriktionsenzyme: E = EcoRI, X = XhoI, H = HindIII, B = BamHI;
Längenmarker im Gel: 1 = "Marker-Mix", 2 = λ-DNA + EcoRI + HindIII.

Aus dem 2,5 %-igen Agarose-Gel (Abb.17 B) konnten für E12 genauere kb-Werte gewonnen werden, da die Trennleistung im Bereich unter 2 kb sehr gut ist (hauchdünne Banden eingeklammert):

Restriktions-enzym(e)	EcoRI +XhoI	XhoI	BamHI +XhoI	HindIII	EcoRI + HindIII	XhoI + HindIII
Fragmente in kb	2,1 1,62 0,78 0,6 (ca. 0,42)	5,6 1,62 0,78	4,8 1,6 0,76	3,5 1,2	1,8 1,18 (0,59)	2,72 0,85 0,75 (ca.0,35)

(Werte größer 4 kb sind wegen der fehlenden Trennschärfe im oberen Gel-Bereich mit einem großen Fehler behaftet).

Die Gegenüberstellung der von unterschiedlichen Gelen stammenden Autoradiogramme in Abb.17 zeigt, daß es auch Banden gibt, die nicht jedesmal auftreten und auch in der pRmR2-Hybridisierung (D.3.2) nicht vorkamen: z.B. die 0,6 kb-Bande bei EcoRI/XhoI-Verdauung oder die 1,8 kb-Bande mit EcoRI/HindIII in Abb.17 B, die 3,95 kb-Bande bei XhoI-Verdauung oder die 2,2 kb-Bande mit XhoI/HindIII in Abb.17 A.

4. Aufstellung von Restriktionskarten der mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen hybridisierenden Region bei 15 verschiedenen Rhizobium meliloti-Wildtyp-Stämmen

4.1 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse

Die kb-Werte der Restriktionsfragmente von R.meliloti-Gesamt-DNA, die mit dem pWK27-Klebsiella-nif-Anteil hybridisieren (D.2 und D.3), sind in Tab.4 zusammengefaßt. Tab.4 stellt eine mit Hilfe der Ergebnisse von D.3 verbesserte und vereinfachte Form von Tab.2 dar. Die in pRmR2 vorkommenden entsprechenden R.meliloti-Fragmente (vgl. Abb.15 und D.3.2) wurden in diese neue Tabelle aufgenommen. Da schon die Dicke der radioaktiven Hybridbanden eine Fehlerquelle darstellt und sich außerdem die zahlreichen Fragmente der Gesamt-DNA-Verdauungen, verglichen mit Einzelbanden kleinerer Plasmide (wie pRmR2), im Gel mehr oder weniger stark aus ihrer eigentlichen Position verdrängen, wurden die Werte der Hybridfragmente soweit möglich an den für pRmR2 gefundenen Werten orientiert. Die korrigierten Werte in Tab.4 sind also durchweg etwas kleiner als die vorläufigen Mittelwerte in Tab.2.
Die auffälligste Abweichung zwischen Tab.2 und 4 ist der Wert des längeren XhoI/HindIII-Fragmentes von Gruppe I und II (3,76 kb in Tab.2), das passend zum HindIII- (3,52 kb) und HindIII/BamHI-Fragment (3,59 kb) in Tab.4 auf 3,5 kb abgerundet wurde. Daß es sich tatsächlich um das gleiche, bei der XhoI/HindIII-Verdauung im Gel stark nach oben verschobene Fragment handelt, beweist die nicht XhoI-spaltbare E7-DNA, deren Hybridfragmente bei XhoI/HindIII Verdauung (HindIII-Muster!) auch im Gel nach oben abgedrängt worden sind (vgl. Abb.10a).
Die gleiche Situation dürfte bei E12 vorliegen, wo die längere HindIII-Bande (3,65 kb in Tab.2) mit großer Wahrscheinlichkeit der 3,5 kb-HindIII-Bande bei Gruppe I und II entspricht, wie aus der HindIII/BamHI-Spaltung von E12-DNA (Tab.2) und der Werte-Tabelle in D.3.3 folgt.

Tab.4: Verbesserte Werte (kb) für die Längen der Rhizobium meliloti-Fragmente, die mit den Klebsiella pneumoniae-Genen nif YKOH in pWK27 hybridisieren, und die ihnen im R.meliloti-Anteil von pRmR2 entsprechenden Fragmente.
(Kräftige Banden im Autoradiogramm sind unterstrichen).

Restriktionsenzym(e)	Gruppe I: E2,E4,E5,E6, 20-1, L5-30	Gruppe II: MVII/1,E1,E3, E7,E8,E9,E10 und E11	Gruppe III: E12	pRmR2
EcoRI	4,0	4,0	4,0	3,97 (4,0)
EcoRI/XhoI	2,0	2,0	1,6 0,75 ca.0,4	1,98 (2,0) 0,72
XhoI	ca.18 (E2 und E8: ca. 8)	ca.18 (E7: keine XhoI-Spaltung!)	6,4 1,6 0,75	- - 0,72
HindIII	3,5 2,1	2,0 3,5	3,5 1,2	- 2,04 (2,1)
EcoRI/HindIII	2,1 1,2	2,0 1,2	1,2 (Doppel-bande!)	2,04 (2,1) 1,18 (1,2)
XhoI/HindIII	3,5 0,8	3,5 0,8	2,8 0,8 0,75 ca.0,4	- 0,8
BamHI	ca.11	ca.15	ca.10	-
BamHI/XhoI	ca. 2	ca. 2	9,3 1,6 0,75	- - 0,72
EcoRI/BamHI	4,0	4,0	4,0	3,97 (4,0)
HindIII/BamHI	3,5 2,1	2,0 3,5	3,5 1,2	- 2,04 (2,1)

4.2 Restriktionskarten für die "nif-Region" der untersuchten R.meliloti-Stämme

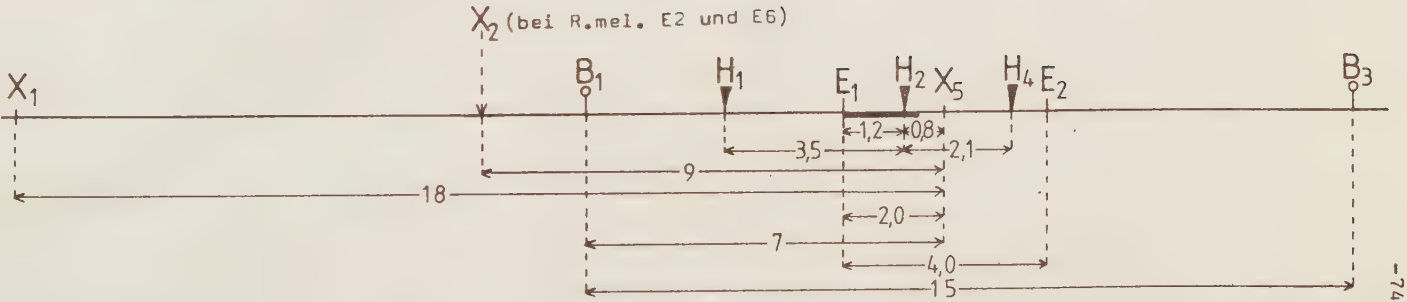
Mit den Werten aus Tab.4 wurde versucht, die DNA-Fragmente der verschiedenen R.meliloti-Stämme, die mit den K.pneumoniae-nif-Genen in pWK27 hybridisieren, in die richtige Reihenfolge zu bringen. Die wichtigste Hilfe waren das hybridisierende R.meliloti-"nif-core" (vgl. D.2.3), an dem die Anordnung der Fragmente orientiert werden konnte, und die Fragmentüberlappungen bei Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen.
Bei R.meliloti E12 wurde eine größtmögliche Übereinstimmung mit Gruppe I und II angenommen; in dieses Gerüst konnten die veränderten Schnittstellen eingefügt werden. Alle vorherigen Versuche, eine Restriktionskarte der E12-nif-Region aufzustellen, waren erfolglos.

Abb.18 zeigt das Resultat. Um die drei R.meliloti-Gruppen untereinander besser vergleichen zu können, wurden die Spaltstellen der einzelnen Restriktionsenzyme von links nach rechts durchnummeriert; identische Schnittstellen in den Gruppen tragen die gleiche Nummer.

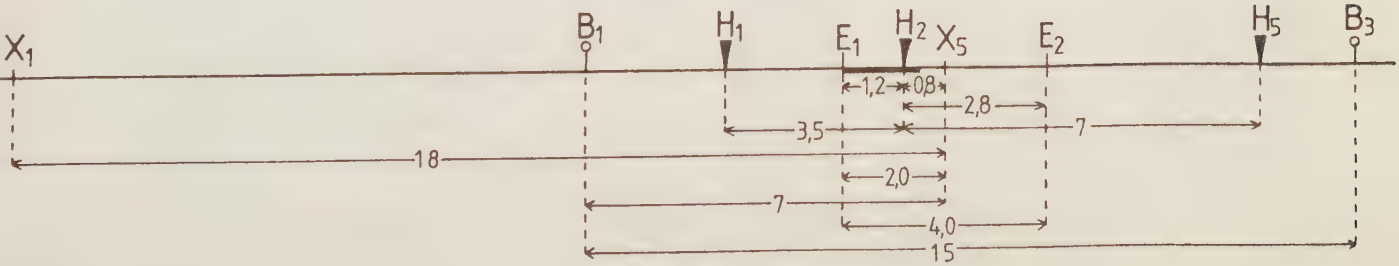
Die veränderten Hybridfragmente der HindIII- und EcoRI/HindIII-Spaltungen bei Gruppe II gegenüber I kommen lediglich durch die fehlende Schnittstelle H_4 zustande. In 2 Stämmen der Gruppe I (E2 und E6) ist der 1.XhoI-Schnitt X_2 links von E_1 näher an die homologe Region herangerückt; bei dem Stamm E7 der Gruppe II fehlen alle XhoI-Schnitte.
Größere Abweichungen treten im Stamm E12 der Gruppe III auf: Die XhoI-Schnittstelle X_4 zwischen E_1 und H_2 in der homologen Region taucht neu auf, ebenso der HindIII-Schnitt H_3 am rechten Rand des homologen Bereichs. Der linke XhoI-Schnitt X_3 und der rechte BamHI-Schnitt B_2 liegen näher am "nif-core", das jedoch auch bei E12 in ein überlappendes BamHI-Fragment B_1-B_2 eingeschlossen ist.

Während die Homologie bei Gruppe I und II nach rechts nicht weit über H_2 hinausgeht, wie aus der Hybridisierungsstärke der XhoI/HindIII-Fragmente gefolgert werden muß, scheint ihre rechte Grenze bei E12 bis etwa H_3 zu gehen.

Gruppe I: R.meliloti E2, E4, E5, E6, 20-1 und LS-30:



Gruppe II: R.meliloti MVII/1, E1, E3, E7 (ohne XhoI-Schnitte!), E8, E9, E10 und E11:



Gruppe III: R.meliloti E12:

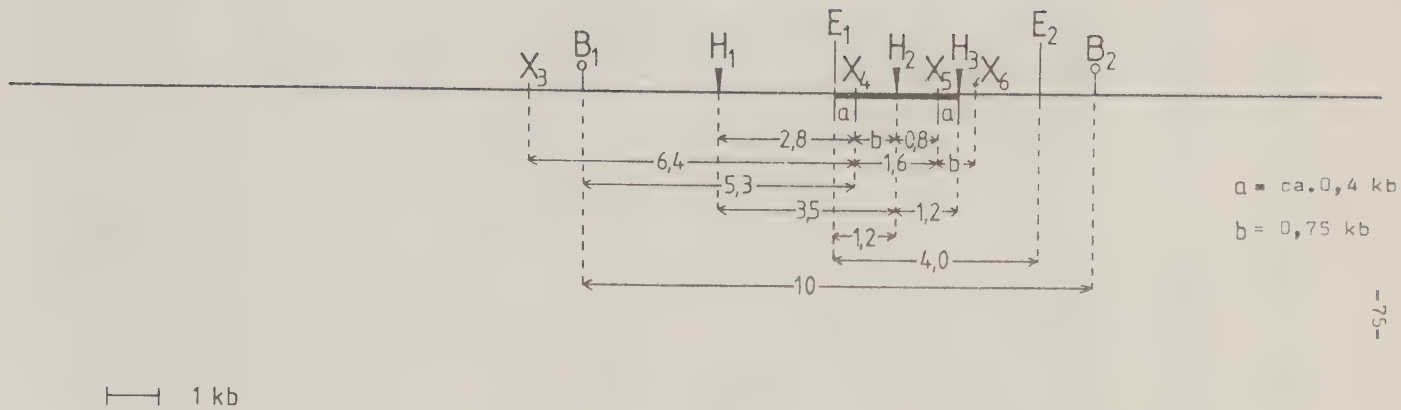


Abb.18: Restriktionskarten für die mit den Klebsiella pneumoniae-Genen nif YKOH hybridisierende Region ("nif-Region") der Rhizobium meliloti-Stämme von Gruppe I, II und III.

▬▬▬ homologer Bereich ("nif-core")

Verwendete Restriktionsenzyme: E = EcoRI, H = HindIII, X = XhoI, B = BamHI.

(Die Indices bezeichnen die Restriktionsschnittstellen der Reihe nach von links nach rechts).

5. Hybridisierung mit klonierter nif-DNA aus K.pneumoniae und R.meliloti

Diese Versuche dienten zur Bestätigung der gefundenen DNA-Homologie in der nif-Region bei K.pneumoniae und R.meliloti (vgl. D.4.2).

5.1 Bestimmung des mit K.pneumoniae-Gesamt-DNA homologen DNA-Abschnitts der in pRmR2 klonierten R.meliloti-"nif-Region"

Um den größtmöglichen homologen Bereich zwischen K.pneumoniae-nif-DNA und dem in pRmR2 klonierten Teil der R.meliloti-nif-Region (vgl. D.3.2 und Abb.15) zu finden, wurde pRmR2-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (EcoRI, HindIII, XhoI) geschnitten, im Agarose-Gel aufgetrennt und nach Southern (C.5) mit ^{32}P-markierter Gesamt-DNA von K.pneumoniae hybridisiert. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, daß die gesamte K.pneumoniae-nif-DNA eingesetzt wird und kein Trägerplasmid die Hybridisierungsergebnisse stört. pWK120 (vgl. Abb.3) enthält zwar auch die ganze Klebsiella-nif-Region, sein Trägerplasmid pWL625 hybridisiert aber mit pACYC184, dem Vektor von pRmR2 (s. D.5.2 und Abb.20 H).

Abb.19 zeigt das Ergebnis:

A) Der Vektor pACYC184 hybridisiert nicht mit K.pneumoniae-DNA.

Für die pRmR2-Verdauungen B) - F) vgl. jeweils die Bezeichnung der Restriktionsstellen und die Längenangaben in Abb.15:

B) Das stark hybridisierende 4.Fragment im Gel und das deutlich schwächer hybridisierende 2.Fragment bei EcoRI/HindIII-Verdauung entsprechen den pRmR2-Abschnitten E_1H_1 bzw. H_1H_2;

C) bei XhoI-Spaltung hybridisiert das Fragment X_3X_1 (Gegenuhrzeigersinn),

D) bei EcoRI/XhoI-Doppelverdauung E_1X_1,

E) bei HindIII/XhoI-Doppelverdauung hybridisieren H_3H_1 (Gegenuhrzeigersinn) stark und H_1X_1 (3.Fragment) ziemlich schwach,

F) bei EcoRI/HindIII/XhoI-Dreifachverdauung tauchen das 3.Fragment (E_1H_1) und schwach das 4.Fragment (H_1X_1) im Autoradiogramm auf.

Es folgen die Hybridisierungskontrollen G) und H):

G) EcoRI-gespaltene Gesamt-DNA von R.meliloti MVII/1 (stellvertretend für R.meliloti-DNA) besitzt nicht nur die erwartete sehr kräftige Hybridbande bei 4 kb (Pfeil; vgl. D.2.2.1), sondern darüber hinaus noch eine Reihe weiterer zu K.pneumoniae homologer DNA-Bereiche;

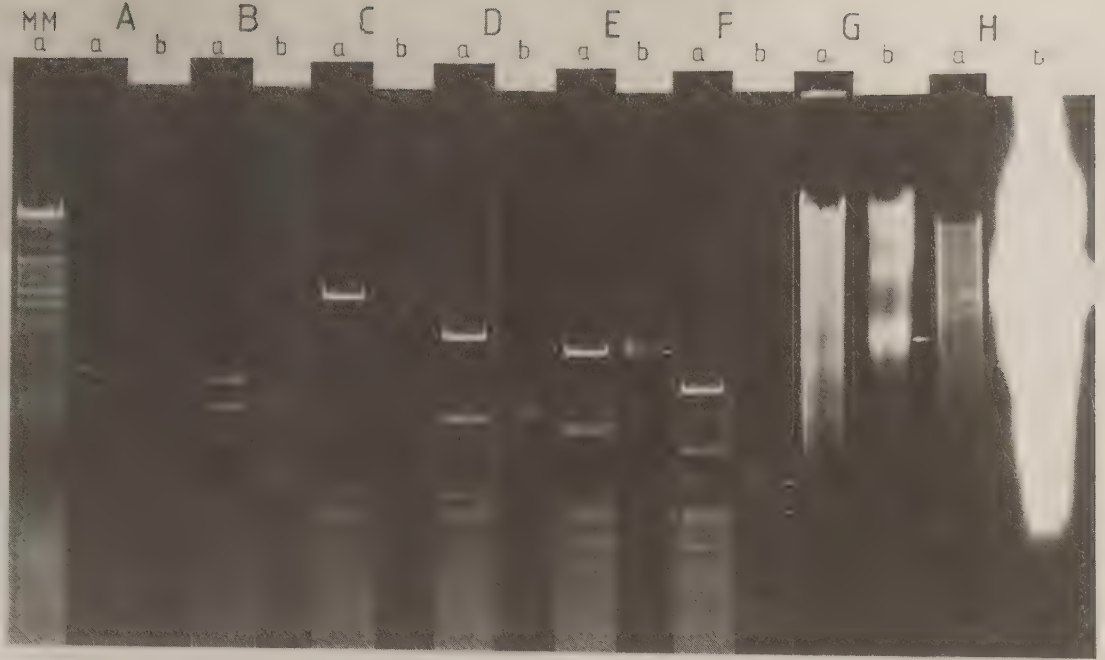


Abb.19: a) Gel-Elektrophorese (0,7 % Agarose, 2 h 100 V, 4°C) folgender mit Restriktionsenzymen verdauter Plasmid- oder Gesamt-DNA's:
A) pACYC184 + E + H, B) pRmR2 + E + H, C) pRmR2 + X, D) pRmR2 + E + X, E) pRmR2 + H + X,
F) pRmR2 + E + H + X, G) Gesamt-DNA von R.meliloti MVII/1 + E,
H) Gesamt-DNA von K.pneumoniae M5a1 + E
(E = EcoRI, H = HindIII, X = XhoI)

b) Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-markierter Gesamt-DNA von Klebsiella pneumoniae M5a1.

(MM = "Marker-Mix").

b) EcoRI-verdaute Gesamt-DNA von K.pneumoniae M5a1 führt bei Hybridisierung mit sich selber zu der erwarteten intensiven Schwärzung im Autoradiogramm.

Der Versuch zeigt, daß sich in der in pRmR2 klonierten R.meliloti-DNA (Abb.15) der mit K.pneumoniae-Gesamt-DNA homologe Bereich nur auf das 1,2 kb-EcoRI/HindIII-Fragment und einen Teil des 0,8 kb-HindIII/XhoI-Fragmentes (deutlich schwächere Hybridisierung!) erstreckt. Das gleiche Ergebnis aus den Hybridisierungen nur mit den Klebsiella-Genen nif YKDH in pWK27 (vgl. D.2 und D.3) ist bereits in Abb.18 für die R.meliloti-Stämme der Gruppen I und II dargestellt.

5.2 Bestimmung der mit R.meliloti-Gesamt-DNA homologen nif-Gene von K.pneumoniae

Hier sollte untersucht werden, ob außer den Genen YKDH in pWK27 noch weitere K.pneumoniae-nif-Gene mit R.meliloti-DNA hybridisieren.
Da die Klebsiella-nif-Gene im Gegensatz zu den R.meliloti-nif-Genen gut charakterisiert sind (8, 47, 48), wurden hier in Umkehrung von D.2 und D.3 die Restriktionsfragmente der Plasmid-DNA von pWK120 (gesamte K.pneumoniae-nif-Region, vgl. Abb.3) und pWK27 im Gel aufgetrennt und mit radioaktiver R.meliloti-Gesamt-DNA hybridisiert. Der Erlanger Stamm MVII/1 wurde dazu willkürlich herausgegriffen. Auch in dieser R.meliloti-DNA müssen wieder alle nif-Gene vorhanden sein, und es stört kein Trägerplasmid (vgl. D.5.1).

Abb.21 faßt das Ergebnis aus Abb.20 schematisch zusammen; der Übersichtlichkeit halber wurden die Plasmide linear gezeichnet und die Restriktionsstellen von links nach rechts durchnummeriert.

Abb.20 zeigt, daß der Vektor pWE825 aus pWK120 mit MVII/1-DNA nicht hybridisiert (A) und daß demnach alle hybridisierenden pWK120-Fragmente (B) dem K.pneumoniae-Anteil dieses Plasmides angehören. Die pWK120-EcoRI/HindIII-Fragmente bandieren im Gel von oben nach unten in der Reihenfolge:

E_5E_6, H_1E_1, $\underbrace{H_2E_2,\ E_5H_1,\ E_2E_3}_{\text{Dreifachbande}}$, E_1H_2, H_3E_5, E_4H_3, E_3E_4 (vgl. Abb.21).

Bei den hybridisierenden Fragmenten handelt es sich also um

- E_5E_6 (Nif-weitere Klebsiella-Gene), sehr schwache Hybridisierung

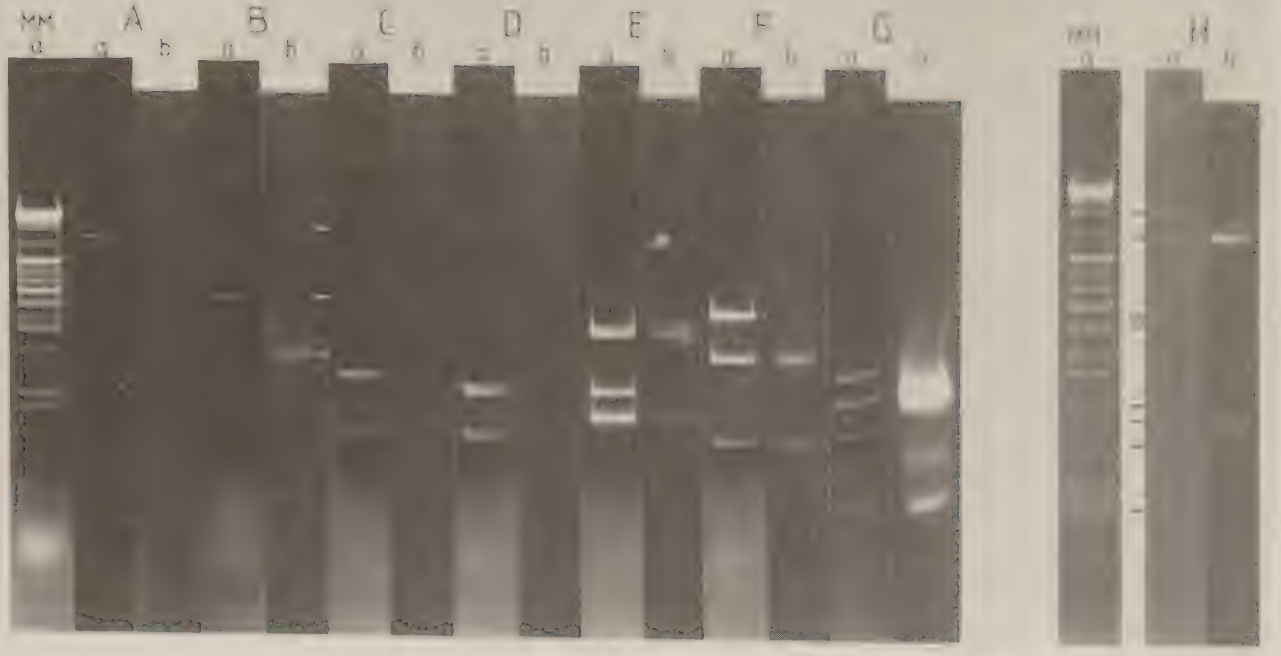


Abb. [illegible]: a) Gel-Elektrophorese (0,7 % Agarose, 7h 100V 4°C bei A-G, 17h 20V 4°C bei H) mit Restriktionsenzymen gespaltener Plasmid-DNA's:
A) [illegible] + E + H, B) pWK120 + E + H, C) [illegible] + E + H, D) [illegible] + E + H + B,
E) pWK27 + E + B, F) pWK27 + H + B, G) pRmR2 + E + H, H) pWK120 + E + H.
(E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI).
b) Autoradiogramme nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-markierter Gesamt-DNA von R.meliloti MVII/1 (A - G) bzw. ^{32}P-pRmR2-DNA (H).
(MM = "Marker-Mix").

- die etwas stärker hybridisierende Dreifachbande H_2E_2, E_6H_1, E_2E_3 mit
  - H_2E_2 (nif QBALF)
  - E_6H_1 (keine nif-Gene)
  - E_2E_3 (nif MVSUX)
- H_3E_5 (nif DH), kräftige Hybridisierung.

Die Gene nif DH, die auch in pWK27 vorliegen, zeigen die eindeutigste Homologie, aber weitere homologe DNA-Bereiche zwischen R.meliloti-Gesamt-DNA und anderen Klebsiella-nif-Genen sind nach diesem Hybridisierungsergebnis nicht ausgeschlossen.

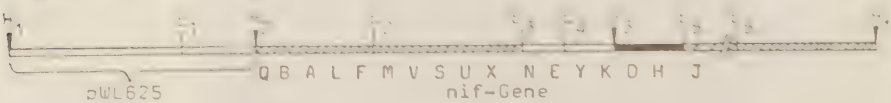
Mit ^{32}P-pRmR2 (H) hybridisiert pWK120 dagegen nur im Fragment H_3E_5 (nif DH). Lediglich die Bande H_1E_1 (nicht E_1H_2!) erscheint noch im Autoradiogramm, da die Trägerplasmide pACYC184 und pWL625 offensichtlich teilweise homologe Sequenzen enthalten.

Da pACYC184 und MVII/1-DNA nicht hybridisieren (C, D), handelt es sich bei den pWK27-Hybrid-Banden in E (EcoRI/BamHI-Verdauung) um die Fragmente E_2B_2 (nif(E)YKD; s.Abb.21) und B_2E_1 (nif H) und in F (HindIII/BamHI-Verdauung) um B_2H_1 (nif H + pACYC184-Anteil), H_2B_2 (nif D) und ganz schwach B_1H_2 (pACYC184-Anteil + nif(E)YK).

Sowohl nif H als auch nif D zeigen deutliche Hybridisierung; nif YK, das bei F im Fragment B_1H_2 abgetrennt von nif D und H vorkommt, enthält bestenfalls geringe Homologie zu MVII/1-DNA.

Die Kontrolle pRmR2 (EcoRI/HindIII-gespalten, G) hybridisiert mit MVII/1-DNA in allen 3 R.meliloti-DNA-Banden (Nummerierung vgl. Abb.15): mit H_1H_2 am stärksten, mit H_2E_2 deutlich weniger und mit E_1H_1 noch schwächer.

pWK120:



pWK27:

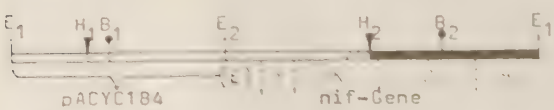
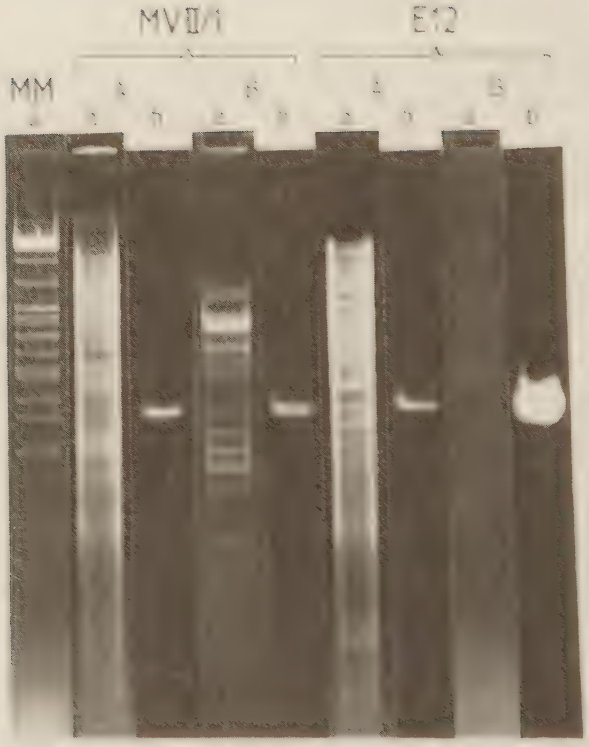


Abb.21: Homologe Bereiche zwischen R.meliloti MVII/1-Gesamt-DNA und K.pneumoniae-nif-Genen in pWK120 und pWK27. (Genanordnung vgl. 9 und 47).
E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI.
Homologie
mögliche Homologie.

6. Suche nach "nif-Genen" in Rhizobium meliloti-Plasmid-DNA

6.1 Hybridisierungen EcoRI-verdauter R.meliloti-Plasmid-DNA mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA

Immer noch stand die Frage offen, ob die gefundene zu K.pneumoniae-nif-Genen homologe Region bei R.meliloti auf dem Chromosom oder einem der Plasmide lokalisiert ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde vorrangig mit den Stämmen MVII/1 (4 Plasmide, (23)) und E12 (1 Plasmid, (23)) gearbeitet. Da mehrere Plasmide in einem Stamm bei der DNA-Isolierung über einen CsCl-EtBr-Dichtegradienten (C.3.5) nicht zu trennen sind, wurde Gesamt-Plasmid-DNA für die Versuche verwendet.
Analog zu Gesamt-DNA (D.2.2) wurde die Plasmid-DNA mit EcoRI gespalten, im Gel aufgetrennt und nach Southern mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA hybridisiert (C.5).
In Abb.22 fällt auf, daß bei MVII/1-Plasmiden die Hybridisierung in einem Bereich auftritt, wo im Gel nur dünne Banden zu sehen sind, und daß bei E12 trotz sehr geringer Plasmid-DNA-Menge im Gel eine verstärkte Hybridisierung im Vergleich mit E12-Gesamt-DNA zu beobachten ist. Bei beiden Stämmen handelt es sich um die schon bei Gesamt-DNA-Spaltungen gefundene 4 kb-EcoRI-Bande; die früher (D.2.2.1) gefundenen kürzeren Fragmente geringerer Intensität (um 2 kb), die zumindest bei E12-Plasmid-Hybridisierungen auch entsprechend dicker hätten erscheinen müssen, traten nie auf, sind also tatsächlich nicht nif-spezifisch (vgl. D.3.1 und D.3.2).
Damit wurde zumindest für R.meliloti MVII/1 und E12 zweifelsfrei nachgewiesen, daß in Gesamt-Plasmid-Isolierungen das mit K.pneumoniae-nif-Strukturgenen hybridisierende DNA-Element enthalten ist.
(Die Plasmid-Proben für diesen Abschnitt wurden von D.Horn, Erlangen, zur Verfügung gestellt).



[illegible]: a) [illegible]
[illegible]
[illegible]
b) [illegible]
[illegible]
[illegible]

6.2 Wiederholung der Hybridisierung mit neu isolierter R.meliloti-Plasmid-DNA

Mit Plasmid-DNA aus späteren Isolierungen konnte bei der gleichen Versuchsdurchführung wie in D.6.1 bei MVII/1 und E12 keine Hybridisierung mit pWK27-DNA mehr nachgewiesen werden, obwohl wesentlich mehr DNA auf das Gel aufgetragen worden war und sich das Plasmid-EcoRI-Fragment-Muster nicht von dem bei erfolgreichen Hybridisierungen unterschied (wie in Abb.23, D.6.3.2). Lediglich die gleichzeitig isolierte Gesamt-DNA zeigte nach wie vor die bisherigen Hybridisierungsergebnisse.

Für eine Erklärung der negativ ausgefallenen Plasmid-Hybridisierung schienen zwei Möglichkeiten denkbar:

1) Die nif-Information könnte in R.meliloti ursprünglich auf einem Plasmid gelegen haben, aber durch die ständige Subkultivierung auf Stammplatte über Monate hinweg dem Plasmid verlorengegangen sein. Es ist vorstellbar, daß mangels Selektionsdruck die Gene für N_2-Fixierung unter diesen Bedingungen nur noch auf dem Chromosom vorhanden sind. Als möglicher Mechanismus dafür wurde eine transposonartige Struktur dieser Genregion angenommen, wodurch sie unter Selektionsdruck in Luzerne- oder Steinklee-Knöllchen auf ein Plasmid (meist mehr als 1 Kopie/Zelle!) springen und somit amplifiziert werden könnte ("Transposon-Hypothese").

2) Ein anderes Denkmodell geht von der Vermutung aus, daß in den R.meliloti-Stämmen sehr lange, bisher im Gel nicht sichtbare "Riesenplasmide" vorkommen. Diese Plasmide (größer 300 MD) sind aufgrund ihrer Größe schwierig zu isolieren, selbst mit der schonenden Methode nach Hansen & Olsen (C.3.4). In wenigen Fällen könnte durch besonders günstige Isolierungsumstände gerade eine ausreichende Menge dieser Plasmide in der Gesamt-Plasmid-DNA vorhanden gewesen sein und so zu den positiven Hybridisierungsergebnissen mit pWK27-DNA geführt haben ("giant-plasmid-Hypothese").

6.3 Versuch, den Transposon-Charakter der nif-Region von R.meliloti nachzuweisen

Um festzustellen, ob sich eine der beiden in D.6.2 erwähnten Hypothesen als richtig erweist, wurde mit einer Auswahl der verwendeten R.meliloti-Stämme eine Pflanzenpassage durchgeführt. Im Falle eines Transposon-Charakters der R.meliloti-nif-Region sollte sich unter diesem Selektionsdruck eine Amplifizierung der nif-Information mit Hilfe der vorhandenen Plasmide ergeben; die Isolierung der Plasmide unmittelbar nach Reisolierung dieser Bakterien aus den Wurzelknöllchen sollte dann zu einer Anreicherung von nif-DNA in den Gesamt-Plasmid-Isolaten und damit zu einer erfolgreichen Hybridisierung mit pWK27-DNA wie in Abb.22 führen.

6.3.1 Reinfektion von Luzerne zur Reisolierung gut Stickstoff-fixierender R.meliloti-Stämme

Luzerne-Keimlinge wurden mit Bakterien der Stämme MVII/1, E7, E10, E12 und L5-30 infiziert (C.6.1). Es entwickelten sich problemlos robuste, kräftig grüne Pflanzen mit zahlreichen durch Leghämoglobin rosa gefärbten Knöllchen, obwohl die zum Animpfen benutzten Bakterien 9 - 15 Monate auf Stammplatte gehalten worden waren. Ein solches Aussehen der Luzerne-Pflanzen weist auf effektive Fixierung von Luftstickstoff hin, da das verwendete Jensen-Nährmedium (C.2.1) keinen gebundenen Stickstoff enthält. (Kontrollpflanzen ohne zugegebene Bakterien sind verkrüppelt und gelblich).
Nach 6 Wochen wurden jeweils aus möglichst großen Wurzelknöllchen die einzelnen Bakterienstämme reisoliert (C.6.2), 1 x auf TY-Platten ausgestrichen und sofort Flüssigkulturen zur DNA-Isolierung nach Hansen & Olsen (C.3.4) mit anschließender CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation (C.3.5) angesetzt. Die Plasmid-DNA-Ausbeuten waren - wie bei Isolierungen dieser langen Plasmide üblich - relativ gering (besonders bei E7), und die DNA mußte stark konzentriert werden (C.3.6). Gleichzeitig wurde aus dem Gradienten auch die dicke obere Bande abgezogen, die chromosomale DNA und Bruchstücke der Plasmide enthält.

D.3.2 Hybridisierung von Plasmid- und Gesamt-DNA aus reisolierten R.meliloti-Stämmen mit ^{32}P-markierter pWK27-DNA

Die DNA's der reisolierten R.meliloti-Stämme MVII/1, E7, E10, E12 und L5-30 wurden mit EcoRI verdaut, im Gel aufgetrennt und nach Southern mit ^{32}P-pWK27-DNA hybridisiert (C.5).
Die Spaltungsmuster der Abb.23 entsprechen in jedem Fall vollständig denen früherer Versuche. Während bei sämtlichen Gesamt-DNA-Spaltungen im Autoradiogramm das gewohnte EcoRI-Hybridmuster auftritt, waren unter den Plasmidfragmenten selbst nach 3-wöchiger Belichtungszeit der Röntgenfilme keine Hybridbanden zu erkennen.

Durch diese Bestätigung des Ergebnisses von D.6.2 ist aber die Transposon-Hypothese hinfällig, da in den sofort nach der Nodulation isolierten Plasmiden der Bakterien keine Anhäufung von nif-DNA vorkam. Selbst wenn das größte Plasmid jedes Stammes der "nif-Träger" gewesen wäre, hätten kleine Mengen davon im Plasmidgemisch für eine erfolgreiche Hybridisierung mit pWK27-DNA ausreichen müssen.
Da aber auch in der Gesamt-DNA keine erhöhte Hybridisierung mit pWK27-DNA zu sehen war, scheint eine Pflanzenpassage die Erbinformation von R.meliloti-Wildtyp-Stämmen nicht zu beeinflussen.

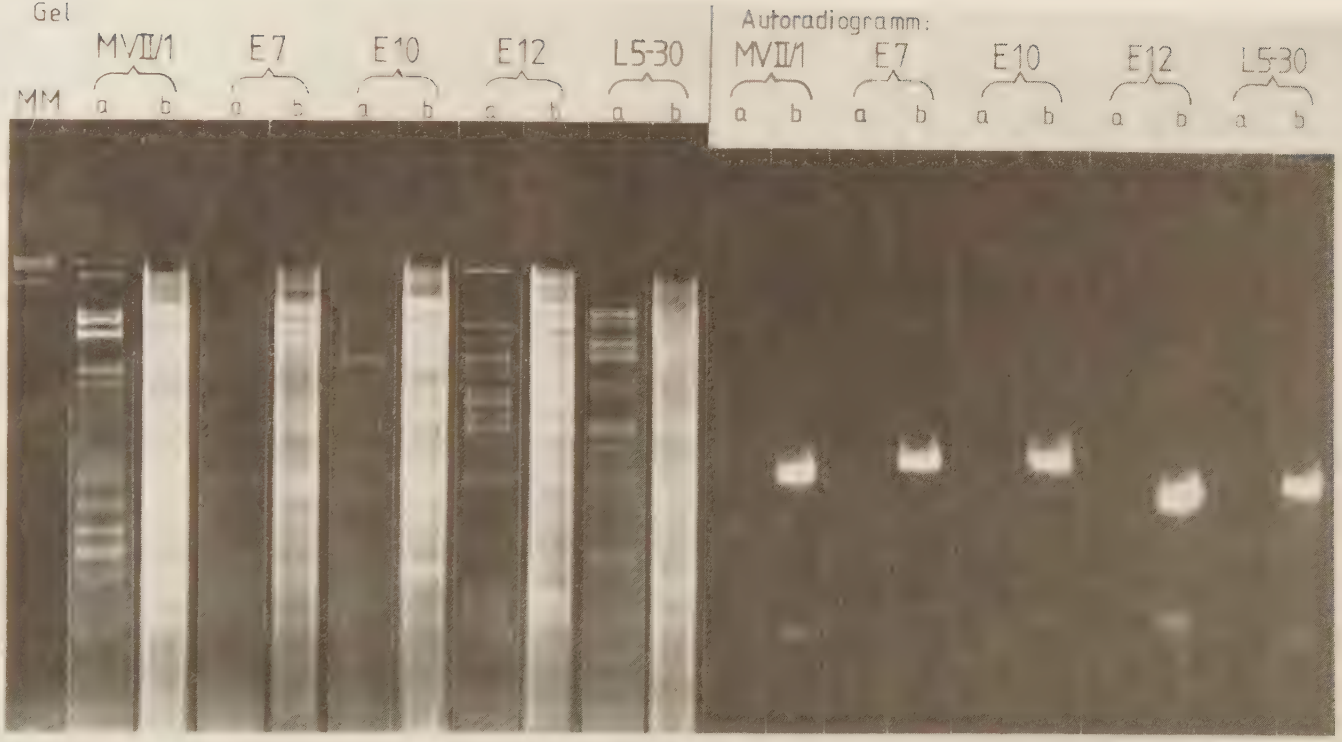


Abb. 24: Gel-Elektrophorese (0,7 % Agarose, 18 h, 25 V, 4°C) EcoRI-verdauter Plasmid-DNA (a) und Gesamt-DNA (b) der S.meliloti-Stämme MVII/1, E7, E10, E12 und L5-30, die aus Luzerne-Wurzelknöllchen reisoliert worden waren, und Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung (C.5.2) mit ^{32}P-pWK27-DNA. (MM = "Marker-Mix").

E. Diskussion

1. Restriktionsanalyse von Rhizobium meliloti-DNA

Spaltungen von R.meliloti-Wildtyp-Gesamt-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI, XhoI, HindIII und BamHI ergaben bei 14 von den 15 untersuchten Stämmen weitgehend übereinstimmende Bandenmuster im Agarosegel; nur R.meliloti E12 wich davon stärker ab. Dieser Umstand ist nicht weiter verwunderlich, da die vorliegenden Chromosomenkarten von R.meliloti 2011 (34), R.meliloti 41 (26) und R.meliloti GR4 (11) zwar ähnlich, aber nicht identisch sind. Obwohl auch gewisse Übereinstimmungen mit der Chromosomenkarte von R.leguminosarum 300 festgestellt werden konnten (27), weicht doch dessen Spaltungsmuster drastisch von denen der R.meliloti-Stämme ab. Die Unterscheidbarkeit verschiedener Rhizobien-Arten durch Restriktionsfragmentmuster im Gel hatten Mielenz et al. auch für R.trifolii, R.japonicum und R.meliloti gefunden (35).
Eine Besonderheit stellt R.meliloti E7-DNA dar. Bei gewohnter Reaktion mit EcoRI, HindIII und BamHI war eine Verdauung mit XhoI nicht möglich. E7 scheint ein - vielleicht Plasmid-codiertes - Modifikationssystem zu besitzen, das die DNA spezifisch gegen Angriffe von XhoI schützt. Da alle XhoI-Schnittstellen wegfallen, kann es sich nicht um eine Mutation handeln.

Für die Plasmid-DNA der verwendeten R.meliloti-Stämme gilt die große Einheitlichkeit der Verdauungsmuster nicht mehr. Diese differieren ebenso, wie sich die einzelnen Stämme in der Anzahl und Länge ihrer Plasmide unterscheiden (13, 23). In den komplizierten Fragmentmustern der Gesamt-Plasmidverdauungen lassen sich im Gel bestenfalls wenige gemeinsame Banden erkennen (vgl. Abb.23).

2. Hybridisierung von R.meliloti-Gesamt-DNA mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen

Bei allen untersuchten Rhizobien-Stämmen trat Hybridisierung der Gesamt-DNA mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen in pWK27, nicht aber mit dem Trägerplasmid pACYC184 auf. Die große Übereinstimmung der R.meliloti-Restriktionsfragmente im Gel spiegelte sich im Muster der Hybridbanden wider; das hybridisierende Kernstück ("nif-core") in R.meliloti beträgt etwa 2 kb.
Ausnahmen bildeten die HindIII- und EcoRI/HindIII-Verdauungen, sowie fast sämtliche Verdauungen (außer mit EcoRI und EcoRI/BamHI) von E12-DNA, wodurch eine Unterteilung der R.meliloti-Stämme in drei Hybridisierungsgruppen möglich ist.
Völlig andere Längen haben - wie aufgrund der Gel-Auftrennung erwartet - die mit pWK27 hybridisierenden DNA-Fragmente von R.leguminosarum 300. Hybridisierung mit diesem Stamm diente als Kontrolle, da Nuti et al. schon 1979 Hybridisierung mit den K.pneumoniae-Genen nif KDH und einem R.leguminosarum 300-Abkömmling gefunden hatten (39).

Bei K.pneumoniae-DNA enthalten 2 benachbarte HindIII-Fragmente von zusammen ca. 24 kb die gesamte nif-Region (9, 45, 46, 47,48). Die HindIII-Spaltstelle liegt genau in den Strukturgenen und ist auf dem EcoRI-Fragment in pWK27 enthalten (Abb.3). K.pneumoniae-DNA hybridisiert nach HindIII-Verdauung folglich mit pWK27 in beiden Fragmenten und kennzeichnet so die vollständige nif-Information. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Rhizobienstämmen lag die Gesamtlänge der hybridisierenden HindIII-Fragmente in jedem Fall weit unter 24 kb. Daher muß angenommen werden, daß die nif-Region in Rhizobien ganz anders organisiert ist als in Klebsiella.
Auf den langen hybridisierenden BamHI-Fragmenten, die bei allen R.meliloti-Stämmen den mit pWK27 hybridisierenden Bereich überspannen, oder auf den XhoI-Fragmenten außer bei E12 könnte dagegen ein großer Teil der R.meliloti-nif-Gene liegen (vgl. Abb.18), falls alle oder viele dieser Gene auch bei R.meliloti an e i n e r Stelle des Genoms nebeneinander vorkommen. Bei Rhizobium könnte aber die nif-Region die bei Klebsiella angenommene Minimallänge von 24 kb wegen der zusätzlichen Symbiose-Gene weit übersteigen.

Bei der Berechnung der Hybridfragmentlängen gab es einige methodische Schwierigkeiten. Da bei Gesamt-DNA-Spaltungen eine Vielzahl

von DNA-Fragmenten im Gel übereinandergestapelt ist, drängen sich die Banden stets etwas aus der Position, die ihnen nach ihrem Molekulargewicht eigentlich zukommt. Das fiel besonders bei XhoI/HindIII-Verdauungen ins Gewicht. Im Gegensatz zu den sehr scharfen DNA-Banden im Gel (deutlich zu sehen bei kürzeren Plasmiden) besitzen Hybridbanden im Autoradiogramm außerdem immer eine gewisse Breite.
Schwankungen von ca. 0,2 kb bei Fragmenten um 3 kb waren deswegen durchaus üblich. Um genaue Werte für den "nif-core"-Bereich zu erhalten, war das Plasmid pRmR2 mit dem hybridisierenden 4 kb-Fragment aus R.meliloti 2011 eine große Hilfe. Bei längeren Fragmenten (etwa ab 5 kb), die in den oberen schlechter auflösenden Bereich der Gele fallen, treten größere Standardabweichungen auf.
Neben den eigentlichen R.meliloti-"nif-Hybridbanden" wurden immer wieder dünnere hybridisierende Banden gefunden. Da das Trägerplasmid pACYC184 keine Homologie zu R.meliloti aufweist (vgl. Abb.20), könnte es sich dabei entweder bei regelmäßig auftauchenden Banden um unspezifisch hybridisierende Fragmente handeln oder bei seltener auftretenden Banden (s. D.3.3 und Abb.17) um zusätzliche Aktivitäten oder unvollständige Spaltungen der eingesetzten Restriktionsenzyme unter den jeweiligen Bedingungen. Durch Hybridisierung mit pRmR2 konnten diese unspezifischen Hybridfragmente erkannt werden. Auch bei Hybridisierung von EcoRI-gespaltener Gesamt-Plasmid-DNA mit pWK27 (vgl. Abb.22) fielen diese dünnen Banden weg.
Ein großes Problem stellte die lange gesuchte R.meliloti E12-Hybridbande von nur 0,4 kb bei EcoRI/XhoI-Spaltung dar. Aus neuer Literatur über den Southern-Transfer kurzer DNA-Fragmente (37, 57) geht hervor, daß Fragmente kleiner 0,5 kb nicht mehr gut an Nitrocellulosefilter mit 0,45 μm Porengröße binden; nur mit einer Steigerung der Salz-Konzentration beim Transfer von üblicherweise 6 x SSC auf 20 x SSC und ohne den anschließenden Waschschritt der NC-Filter mit 2 x SSC können auch noch Fragmente bis zu 0,1 kb (57) an NC festhaften und hybridisieren.

3. Restriktionskarten und Länge der zu den K.pneumoniae-nif-Genen homologen Region in R.meliloti

Aufgrund der Hybridisierungsergebnisse mit pWK27 wurden die verwendeten R.meliloti-Wildtyp-Stämme in drei Hybridisierungsklassen eingeteilt. Die daraus resultierenden Restriktionskarten der mit den K.pneumoniae-nif-Genen YKDH homologen Region ("nif-Region") zeigen, daß sich die 15 R.meliloti-Stämme zumindest in diesem DNA-Abschnitt nicht wesentlich unterscheiden.
Bei den 8 Stämmen der Gruppe II fehlt gegenüber den 6 Stämmen der Gruppe I nur die HindIII-Schnittstelle H_4 (vgl. Abb.18).
In Gruppe I gibt es darüber hinaus noch eine Variation im XhoI-Schnittmuster; R.meliloti E2 und E6 besitzen XhoI-Schnitte (X_2) näher am "nif-core" und damit kürzere homologe XhoI-Fragmente. Der Bereich zwischen E_1 und E_2 bei Gruppe I stimmt exakt mit dem des in pRmR2 klonierten R.meliloti-nif-Fragmentes überein (vgl. Abb.15 und (52)), bei dem nur noch eine weitere XhoI-Spaltstelle (X_3 in Abb.15) außerhalb der homologen Region dazukommt. Die gesamte Restriktionskarte der Gruppe I (im Falle von X_1 als linkem XhoI-Schnitt, Abb.18) gleicht in ihrer Anordnung der von Ruvkun und Ausubel für R.meliloti erstellten Karte (51); dort sind lediglich etwas kürzere Fragmentlängen angegeben.
Bei R.meliloti E12 (= Gruppe III) treten mehr Restriktions-Schnittstellen in oder nahe bei der homologen Region auf. Hier rücken nicht nur der linke XhoI-Schnitt (X_3 in Abb.18) und rechte BamHI- und HindIII-Schnitt (B_2 und H_3) weiter an das "nif-core" heran, sondern ein neuer XhoI-Schnitt (X_4) befindet sich direkt im "nif-core" zwischen E_1 und H_2. Trotzdem bleibt die Position einer ganzen Reihe von Schnittstellen (B_1, H_1, E_1, H_2, X_5 und E_2) im Vergleich mit Gruppe I und II unverändert. Eine große Ähnlichkeit der "nif-Regionen" aller 15 untersuchten R.meliloti-Stämme ist daher wahrscheinlich.

Aus der Stärke der hybridisierenden Banden konnte die Länge der Homologie mit nif YKDH aus K.pneumoniae abgeschätzt werden. Bei GruppeI und II beschränkt sie sich auf den DNA-Bereich zwischen E_1 und X_5 (Abb.18) wie in (51) und ragt vermutlich nicht sehr weit über H_2 nach rechts hinaus, da die Fragmente H_2X_5 immer nur schwach hybridisierten. Im Fall von R.meliloti E12 bilden die immer wieder gefundenen XhoI/HindIII-Hybridfragmente von 0,4 kb einen Hinweis,

daß sich die homologe Region über X_5 hinaus bis H_3 erstrecken könnte.

Zur Bestätigung des Ergebnisses für Gruppe I wurde auch mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespaltene pRmR2-DNA mit Gesamt-DNA von K.pneumoniae hybridisiert (vgl. Abb.19). Obwohl hier alle Klebsiella-nif-Gene zur Hybridisierung eingesetzt worden waren, ergab sich die gleiche Länge für den homologen Bereich wie bei Gruppe I und II:

R.meliloti-Anteil von pRmR2 (vgl. Abb.15)

Dem widersprechen die neuesten Angaben von Ruvkun und Ausubel (52), nach denen die homologe Region bei pRmR2 nach rechts weiter über X_1 (bzw. X_5 in Abb.18) hinausgeht. Diese Aussage steht im Einklang mit den Ergebnissen für R.meliloti E12. Auch bei Gruppe I und II sind Übereinstimmungen mit diesem Schema zu erkennen, da bei manchen Autoradiogrammen von EcoRI/XhoI-Spaltungen noch sehr dünne Banden zwischen 0,7 und 0,8 kb zu finden sind (vgl. Abb.7) und die unterste Bande bei einigen XhoI/HindIII-Verdauungen (vgl. Abb.9b) wie eine Doppelbande mit einem unteren Fragment in derselben Größenordnung aussieht. Dieses sehr schwach hybridisierende Fragment könnte dem an X_1 in pRmR2 anschließenden XhoI-Fragment X_1X_2 (0,72 kb) entsprechen, dürfte aber kaum noch Homologie zur Klebsiella-nif-Region enthalten.

Die Umkehrung des Versuches mit pWK27-Fragmenten auf dem Gel und Hybridisierung mit MVII/1-Gesamt-DNA (vgl. Abb.20) ergab, daß vom Klebsiella-Anteil in diesem Plasmid nur der Bereich von nif D und H hybridisierte, eventuell auch ein ganz kleiner Abschnitt des rechten Endes von nif K (vgl. Abb.21). Das steht in Einklang mit den Resultaten einer Reihe anderer Arbeitsgruppen, die bei den verschiedensten N_2-fixierenden Mikroorganismen - Rhizobien (29, 39, 40, 51, 52); Azotobacter vinelandii, photosynthetischen Bakterien, Clostridium pasteurianum, Actinomyceten (51) und Blaualgen (33, 51) - immer nur Homologie zu nif D und H von K.pneumoniae fanden.

Verwendete man jedoch Fragmente von pWK120 mit der gesamten K.pneu-

moniae-nif-Region, so führte eine Hybridisierung mit pRmR2-DNA nur zu Homologie mit dem nif DH-Fragment (vgl. Abb.20 H), eine Hybridisierung mit R.meliloti-Gesamt-DNA aber zu weiteren schwächer hybridisierenden Banden (vgl. Abb.20 B). Diese gehören entweder zu den Klebsiella-nif-Genen Q - X und J (vgl. Abb.21) oder aber zu anderen Genen (z.B. shiA), die noch zusätzlich in pWK120 enthalten sind. Da mit einem Plasmid, in dem nur nif Q - K kloniert war (39), keine Hybridfragmente entdeckt werden konnten und da R.meliloti-Gesamt-DNA mit ^{32}P-K.pneumoniae-DNA auch in etlichen Fragmenten außer der "nif-Region" hybridisiert (vgl. Abb.19 C), besteht die Möglichkeit, daß auf diesen schwächer hybridisierenden pWK120-Fragmenten Gene für beiden Bakterienarten gemeinsame Stoffwechselwege mit ähnlichen Enzymen liegen.
Es spricht also vieles dafür, daß sich bei R.meliloti und K.pneumoniae wie bei den anderen oben angeführten Mikroorganismen sequenzhomologe DNA-Bereiche nur für die Nitrogenase-Strukturgene nif D und H erhalten haben, daß dieser DNA-Abschnitt in R.meliloti, wie aus neuesten Versuchen mit pRmR2::Tn5-Mutanten hervorgeht (52), aber auch eine wesentliche Rolle in der symbiontischen Stickstoff-Fixierung spielt. Aus den bisher publizierten Daten läßt sich jedoch die genaue Länge der Sequenzhomologie noch nicht ganz klar festlegen (3).

4. Lokalisierung der R.meliloti-nif-DNA

Mit gereinigter R.meliloti-Plasmid-DNA gelang Hybridisierung mit den K.pneumoniae-nifYKDH-Genen in pWK27 nur bei MVII/1 und E12. Dort trat bei EcoRI-Verdauung eine Hybridbande in der gleichen Position (4 kb) wie bei Versuchen mit Gesamt-DNA auf, die bei E12 trotz geringer DNA-Mengen auf dem Gel viel kräftiger war (vgl. Abb.22). Diesen Effekt einer starken Hybridisierung mit Plasmid-DNA und einer schwachen mit Gesamt-DNA beschreiben Krol et al. auch für R.leguminosarum, da in Gesamt-DNA-Präparationen nur 3-4 % Plasmid-DNA enthalten seien (29).
Wiederholungsversuche mit neuen Plasmid-Isolierungen derselben und der übrigen R.meliloti-Stämme führten jedoch meist nicht zu diesen deutlichen Hybridbanden, sondern bestenfalls noch zu ganz schwachen. Das war besonders bei dem Stamm L5-30 erstaunlich, da Nuti et al. schon 1979 behaupteten, daß das dort gefundene 90 MD-Plasmid mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen hybridisiere (39).
Zur Erklärung wurde zunächst die "Transposon-Hypothese" herangezogen, die davon ausgeht, daß unter Selektionsdruck, also in Symbiose mit einer Pflanze, die Information für N_2-Fixierung in mehreren Kopien vorliegt, aber außerhalb der Pflanze, z.B. auf Stammplatte, zwar erhalten bleibt, jedoch in erniedrigter Kopienzahl. Es wurde vermutet, daß die nif-DNA bei freilebenden R.meliloti-Bakterien nur noch auf dem Chromosom vorkommt. Unter Nodulationsbedingungen sollte dieser ganze DNA-Bereich mit Hilfe eines Transposon-Mechanismus auf ein Plasmid springen, somit amplifiziert und optimaler exprimiert werden.
Diese transposonartige Struktur war bei der K.pneumoniae-nif-Region im Elektronenmikroskop nachgewiesen worden (46); dort bilden sich bei Homoduplex-Experimenten an jedem Ende der nif-Region durch eine Reihe von "inverted-repeat"-Sequenzen sogenannte "Katzenkopf-Strukturen" und ergeben so eine transposonartige Gesamtstruktur.
Plasmid-DNA, die sofort nach Luzerne-Reinfektionsversuchen aus reisolierten R.meliloti-Bakterien gewonnen worden war, hätte nach dieser Hypothese durch die gesteigerte Kopienzahl der nif-DNA auf den Plasmiden zu sehr starker Hybridisierung führen müssen; das konnte aber bei keinem Stamm beobachtet werden.

In Zusammenarbeit mit Dagmar Horn wurde ein weiterer Versuch unternommen, nif-DNA auf einem R.meliloti-Plasmid nachzuweisen (23). Klonierung des 4 kb-nif-Fragmentes aus R.meliloti E12 in einen Plasmidvektor hätte die erstellte E12-nif-Restriktionskarte bestätigen können und die Möglichkeit geboten, die Fragmentlängen mit Gelelektrophorese genauer zu bestimmen.

Das 107 MD-Plasmid von R.meliloti E12 wurde mit EcoRI gespalten, in pACYC184 kloniert und die entstandene Genbank durch Hybridisierung mit dem pWK27-nif-Fragment auf nif-DNA getestet. In keinem einzigen Klon war ein eindeutiger Nachweis von nif-spezifischen Hybridfragmenten möglich. Zu dem gleichen Ergebnis kam Cannon bei der Klonierung des 90 MD-L5-30-Plasmides (10). Die noch relativ leicht isolierbaren R.meliloti-Plasmide scheinen also zur Klonierung von R.meliloti-nif-DNA nicht geeignet zu sein.

Für die zweite Hypothese ("giant plasmid-Hypothese"), die schwierig zu isolierende sehr lange Plasmide neben den bisher in Rhizobien gefundenen postuliert, gibt es mittlerweile eine ganze Reihe von Hinweisen. So entdeckte Dénarié Riesenplasmide von mehr als 300 MD bei R.meliloti, auf denen die nod- und fix-Gene lokalisiert sein sollen (15). Hombrecher konnte nif-spezifische Hybridisierung bei sehr langen R.leguminosarum-Plasmiden zeigen (22). Längere extrachromosomale DNA als bisher konnte inzwischen mit ganz sanften Isolierungsmethoden auch bei den hier untersuchten R.meliloti-Stämmen, einschließlich E12 und MV11/1, entdeckt werden (24), und Ruger fand in einigen Stämmen bei Riesenplasmiden Hybridisierung mit pRmR2-DNA (24). Vermutlich hängt es von der Menge der in Plasmid-Isolierungen enthaltenen Riesenplasmid-DNA ab, ob es in Einzelfällen wie in Abb.22 doch zu Hybridisierung der reinen Plasmid-DNA mit K.pneumoniae-nif-Strukturgenen kommt.
Daß nicht immer Riesenplasmide für die Symbiose-Gene verantwortlich sein müssen, zeigen die R.leguminosarum-Plasmide pRL1JI mit 120 MD (5, 8) und pRL5JI mit 160 MD (6), die Gene für Wirtsbereich, Nodulierung und N_2-Fixierung übertragen, oder pRP1JI aus R.phaseoli (ca. 200 MD) mit Genen für effektive Nodulierung von Phaseolus (4). Aus einem 200 MD-Plasmid von R.meliloti 41 gelang Kondorosi auch die Klonierung der R.meliloti-nif-Region von ca. 40 kb (28). Weitere Hinweise für eine Plasmid-gebundene nif-Region lieferten symbiontisch defekte Mutanten von R.leguminosarum (8, 12, 13),

R.trifolii (59) und R.meliloti (28), bei denen dieser Phänotyp durch den Verlust eines großen Plasmides oder durch eine größere Deletion in einem der Plasmide, z.B. durch Inkubation bei erhöhter Temperatur, entstanden war. Auch bei Transposon-Mutagenese mit Tn5 bei pRL1JI (8) konnten in vielen Fällen Symbiose-defekte Rhizobien-Stämme durch die veränderten Plasmide nicht mehr in den Nod^+Fix^+-Phänotyp umgewandelt werden. Das beweist eindeutig, daß pRL1JI für unbedingt notwendige Gene der symbiotischen Stickstoff-Bindung codiert.
Krol (29) führte schließlich noch Hybridisierungen von Plasmid-DNA aus R.leguminosarum mit RNA aus freilebenden Bakterien und Bakteroiden durch. Daraus ergab sich, daß Plasmid-spezifische mRNA vorwiegend in Bakteroiden vorkommt und Plasmidgene nur dort stark exprimiert werden. Plasmid-DNA und Bakteroid-RNA hybridisierten auch mit den K.pneumoniae-nif-Strukturgenen D und H. Es muß also wenigstens ein Teil der nif-Gene bei R.leguminosarum auf Plasmiden liegen.
Aufgrund dieser Ergebnisse dürften nif-Gene auf Plasmiden in Rhizobien weit verbreitet sein. Neben den Strukturgenen für den Nitrogenase-Komplex scheint häufig auch ein wesentlicher Teil dieser Plasmide genetische Informationen zu enthalten, die in der Symbiose eine Rolle spielen, wie z.B. Gene für den Infektionsvorgang bei den Leguminosen oder für die Differenzierung der Bakteroide.

5. Abschließende Bemerkungen und Ausblick

R.meliloti-Stämme sind trotz meist sehr ähnlicher Gesamt-DNA-Restriktionsmuster im Agarose-Gel nicht so einheitlich, wie ursprünglich angenommen. Sie weichen nicht nur in ihrem Plasmidmuster beträchtlich voneinander ab, sondern reagieren auch bei Hybridisierung mit einem klonierten R.meliloti-Fragment, dem nif-DNA enthaltenden 4 kb-Fragment in pRmR2, ganz verschieden, da unterschiedlich viele und lange Fragmente zusätzlich zu den nif-spezifischen hybridisieren (vgl. Abb.16). Ein Teil dieser neuen Hybrid-Fragmente stimmt mit Fragmenten im pRmR2-Bereich X_1E_2 (Abb.15) überein. Weitere Hybridbanden könnten durch Hybridisierung eines nach rechts über E_2 (Abb.18) hinausreichenden Fragmentes entstanden sein. Da aber häufig (bei L5-30, E4 und MVII/1, nicht bei E1 und E12) mehr als e i n e Hybridbande zusätzlich entsteht, für die diese letzte Erklärung paßt, liegt die Vermutung nahe, daß eine im X_1E_2-Anteil von pRmR2 vorhandene Sequenz in einigen R.meliloti-Stämmen an verschiedenen Stellen des Genoms und in unterschiedlicher Kopienzahl vorkommen kann.

Es ist nicht verwunderlich, daß auch die Genregion im mit K.pneumoniae-nif-Genen hybridisierenden "nif-core" und seiner Umgebung bei den 15 untersuchten Stämmen nicht völlig übereinstimmt. Erstaunlicherweise bildet bei Hybridisierung von pRmR2 mit R.meliloti MVII/1-Gesamt-DNA (vgl. Abb.20 G und D.5.2) das pRmR2-Fragment mit dem größten Teil des "nif-core" nicht die kräftigste, sondern die schwächste Hybridbande. Offensichtlich gibt es also auch im nif-Gen-Bereich bei den einzelnen R.meliloti-Stämmen größere Sequenzabweichungen. Daraus folgt, daß in einer natürlichen R.meliloti-Population, wie sie die 13 verwendeten Stämme aus dem Raum Erlangen darstellen, eine gewisse genetische Heterogenität herrscht, vielleicht ähnlich den Modifikationen, die man bei Pflanzen an verschiedenen Standorten beobachtet.

Die Restriktionskarten des R.meliloti-Genbereiches, der die Homologie zu K.pneumoniae-nif-Genen enthält, können nicht nur zum Vergleich dieses DNA-Abschnittes bei den Gruppen I - III herangezogen werden, sondern auch dazu, daß die R.meliloti-"nif-Region" oder Teile davon bei Klonierungen definiert abgegriffen werden können. Nur durch solche Klonierungsexperimente wird man das Ausgangsmaterial für eine genaue und umfassende genetische und biochemische Analyse und Charakterisierung der R.meliloti-nif-Gene erhalten

können, wie sie für K.pneumoniae bereits vorliegt. Die Aufklärung der allen Symbiose-Leistungen zugrunde liegenden genetischen Information bei Rhizobien scheint unerläßlich, um dem angestrebten Ziel - Mikroorganismen zu entwickeln, die mit allen wichtigen Nutzpflanzen effektiv Stickstoff fixieren - näher zu kommen.

F. Literatur

1) Bazaral,M. und D.R.Helinski:
Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from Escherichia coli
J.Mol.Biol. 36, 185-194 (1968)

2) Beringer,J.E.:
The development of Rhizobium genetics
J.Gen.Microbiol. 116, 1-7 (1980)

3) Beringer,J.E.:
Finding nitrogen fixation genes
Nature 289, 16 (1981)

4) Beynon,J.L., J.E.Beringer und A.W.B.Johnston:
Plasmids and host range in Rhizobium leguminosarum and R.phaseoli
J.Gen.Microbiol. 120, Part 2, 421-429 (1980)

5) Brewin,N.J., J.E.Beringer, A.V.Buchanan-Wollaston, A.W.B.Johnston und P.R.Hirsch:
Transfer of symbiotic genes with bacteriogenic plasmids in Rhizobium leguminosarum
J.Gen.Microbiol. 116, 261-270 (1980)

6) Brewin,N.J., J.E.Beringer und A.W.B.Johnston:
Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum
J.Gen.Microbiol. 120, Part 2, 413-420 (1980)

7) Brill,W.J.:
Biochemical genetics of nitrogen fixation
Microbiol. Reviews 44, No.3, 449-467 (1980)

8) Buchanan-Wollaston,A.V., J.E.Beringer, N.J.Brewin, P.R.Hirsch und A.W.B.Johnston:
Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium leguminosarum by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid
Molec.gen.Genet. 178, 185-190 (1980)

9) Cannon,F.C., G.E.Riedel und F.M.Ausubel:
Overlapping sequences of Klebsiella pneumoniae nif DNA cloned and characterised
Molec.gen.Genet. 174, 59-66 (1979)

10) Cannon,F.C.:
pers. Mitteilung (1980)
11) Casadesús,J. und J.Olivares:
Rough and fine linkage mapping of the Rhizobium meliloti chromosome
Molec.gen.Genet. 174, 203-209 (1979)
12) Casse,F., C.Boucher, J.S.Julliot, M.Michel, J.Dénarié:
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis
J.Gen.Microbiol. 113, 229-242 (1979)
13) Casse,F., M.David, P.Boistard, J.S.Julliot, C.Boucher, L.Jouanin, L.Huguet, J.Dénarié:
Presence of large plasmids and use of Inc P-1 factors in Rhizobium
in: "Plasmids of medical, environmental and commercial importance", K.N.Timmis, A.Pühler Eds.,
Elsevier North Holland Biomed. Press, 327-338 (1979)
14) Chen,J.S., J.S.Multani, L.E.Mortenson:
Structural investigation of nitrogenase components from Clostridium pasteurianum and comparison with similar components of other organisms
Biochim.Biophys.Acta 310, 51-59 (1973)
15) Dénarié,J.:
pers. Mitteilung (1980)
16) Denhardt,D.T.:
A membrane-Filter technique for the detection of complementary DNA
Biochim.Biophys.Res.Commun. 23, 641-646 (1966)
17) Dixon,R., F.Cannon, A.Kondorosi:
Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae
Nature 260, 268-271 (1976)
18) Emerich,D.W. und R.H.Burris:
Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria
J.Bact. 134, No.3, 936-943 (1978)
19) Glover,D.M.:
pers. Mitteilung (1976)

20) Gross,D.C., A.Vidaver, R.Klucas:
Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in Rhizobium japonicum strains indigenous to alkaline soil
J.Gen.Microbiol. 114, 257-266 (1979)

21) Hansen,J.B. und R.H.Olsen:
Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 und pMG5
J.Bact. 135, 227-238 (1978)

22) Hombrecher,G.:
pers. Mitteilung (1980)

23) Horn,D.:
Identifizierung und Charakterisierung von Plasmiden aus Wildtyp-Stämmen von Rhizobium meliloti
Diplomarbeit (1981)

24) Horn,D., R.Springer, A.Pühler, B.Rüger:
pers. Mitteilung (1981)

25) Johnston,A.W.B., J.L.Beynon, A.V.Buchanan-Wollaston, S.M.Setchell, P.R.Hirsch, J.E.Beringer:
High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium
Nature 276, 634-636 (1978)

26) Kondorosi,A., G.B.Kiss, T.Forrai, E.Vincze, Z.Banfalvi:
Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome
Nature 268, 525-527 (1977)

27) Kondorosi,A., E.Vincze, A.W.B.Johnston, J.E.Beringer:
A comparison of three Rhizobium linkage maps
Molec.gen.Genet. 178, 403-408 (1980)

28) Kondorosi,A.:
pers. Mitteilung (1980)

29) Krol,A.J.M., J.G.J.Hontelez, R.C.Van den Bos und A.Van Kammen:
Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of Rhizobium leguminosarum
Nucleic Acids Research 8, No.19, 4337-4347 (1980)

30) Laskey,R.A. und A.D.Mills:
Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography
Eur.J.Biochem. 56, 335-341 (1975)

31) MacNeil,T., D.MacNeil, G.Roberts, M.Supiano, W.J.Brill:
Fine-structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae
J.Bact. 136, No.1, 253-266 (1978)

32) Mahl,M.C., P.W.Wilson, M.A.Fife, W.M.Ewing:
J.Bact. 89, 1482 (1965)

33) Mazur,B.J., D.Rice und R.Haselkorn:
Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes
Proc.Natl,Acad.Sci. USA 77, No.1, 186-190 (1980)

34) Meade,H.M. und E.R.Signer:
Genetic mapping of Rhizobium meliloti
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, No.5, 2076-2078 (1977)

35) Mielenz,J.R., L.E.Jackson, F.O'Gara, K.T.Shanmugam:
Fingerprinting bacterial chromosomal DNA with restriction endonuclease EcoRI: Comparison of Rhizobium spp. and identification of mutants
Can.J.Microbiol. 25, 803-807 (1979)

36) Müller,W. und D.M.Crothers:
Interaction of heteroaromatic compounds with nucleic acids. I. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specifity of intercalating ligands
Eur.J.Biochem. 54, 267-277 (1975)

37) Nagamine,Y., A.Sentenac, P.Fromageot:
Selective blotting of restriction DNA fragments on nitrocellulose membranes at low salt concentrations
Nucleic Acids Research 8, No.11, 2453-2460 (1980)

38) Nonoyama,M. und J.S.Pagano:
Homology between Epstein-Barr virus DNA and viral DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma determined by DNA-DNA reassociation kinetics
Nature 242, 44-47 (1973)

39) Nuti,M.P., A.A.Lepidi, R.K.Prakash, R.A.Schilperoort, F.C.Cannon:
Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids
Nature 282, 533-535 (1979)

40) Nuti,M.P., A.A.Lepidi, R.K.Prakash, P.J.J.Hooykaas, R.A.Schilperoort:
The plasmids of Rhizobium and symbiotic nitrogen fixation in "Molecular Biology of Plant Tumors" (editors: G.Kahl & J.Schell), Academic Press Inc. NY, USA (1980)

41) Philippsen,P., R.A.Kramer, R.W.Davis:
Cloning of the yeast ribosomal DNA repeat unit in SstI and HindIII Lambda vectors using genetic and physical size selections
J.Mol.Biol. 123, 371-386 (1978)

42) Philippsen,P.:
pers. Mitteilung für Boehringer, Mannheim (Biochemica: Preisliste 1980/81, 1.Nachtrag, DNA-Längenstandards III)

43) Postgate,J.R. et al.:
Some aspects of the physiology of dinitrogen fixation in "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur", edited by H.Bothe & A.Trebst, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 103-115 (1981)

44) Prakash,R., P.Hooykaas, A.Ledeboer, J.Kijne, R.Schilperoort, M.Nuti, A.Lepidi, F.Casse, C.Boucher, J.Julliot, J.Dénarié:
Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium
in "Proceedings of the Third International Symposium on Nitrogen Fixation", edited by W.H.Orme-Johnson & W.E.Newton. Madison: University Park Press (1979)

45) Pühler,A., H.J.Burkardt, W.Klipp:
Cloning of the entire region for nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae in a multicopy plasmid vehicle in Escherichia coli
Molec.gen.Genet. 176, 17-24 (1979)

46) Pühler,A., H.J.Burkardt, W.Klipp:
Cloning in Escherichia coli the genomic region for Klebsiella pneumoniae which encodes genes responsible for nitrogen fixation in "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance" (editors: K.N.Timmis & A.Pühler)
Elsevier North Holland Biomed. Press, 435-447 (1979)

47) Pühler,A. und W.Klipp:
Fine structure analysis of the gene region for N_2-fixation (nif) of Klebsiella pneumoniae
in "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur", edited by H.Bothe & A.Trebst, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 276-286 (1981)

48) Riedel,G.E., F.M.Ausubel und F.C.Cannon:
Physical map of chromosomal nitrogen fixation (nif) genes of Klebsiella pneumoniae
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, No.6, 2866-2870 (1979)

49) Rigby,P.W.J., M.Dieckmann, C.Rhodes, P.Berg:
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I
J.Mol.Biol. 113, 234-251 (1977)

50) Roberts,G.P., T.MacNeil, D.MacNeil, W.J.Brill:
Regulation and characterization of protein products coded by nif (nitrogen fixation) genes of Klebsiella pneumoniae
J.Bact. 136, No.1, 267-279 (1978)

51) Ruvkun,G.B. und F.M.Ausubel:
Interspecies homology of nitrogenase genes
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, No.1, 191-195 (1980)

52) Ruvkun,G.B. und F.M.Ausubel:
A general method for site directed mutagenesis in prokaryotes
Nature 289, 85-88 (1981)

53) Sharp,P.A., B.Sugden, J.Sambrook:
Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis
Biochemistry 12, No.16, 3055-3063 (1973)

54) Southern,E.M.:
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J.Mol.Biol. 98, 503-517 (1975)

55) Spitzbarth,M., A.Pühler und W.Heumann:
Characterization of plasmids isolated from Rhizobium meliloti
Arch.Microbiol. 121, 1-7 (1979)

56) Spitzbarth,P.:
Molekulare Charakterisierung von Insertionsmutanten des RP4-Plasmides
Dissertation, Erlangen (1978)

57) Thomas,P.S.:
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, No.9, 5201-5205 (1980)

58) Vincent,J.M.:
A manual for the practical study of root nodule bacteria
IBP Hand Book Nr.15, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970)

59) Zurkowski,W. und Z.Lorkiewicz:
Plasmid-mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii
Arch.Microbiol. 123, 195-201 (1979)

60) Jäckel,B.:
unveröffentlichte Ergebnisse

61) Collins,J.:
pers. Mitteilung (1979)

62) Pühler,A.:
pers. Mitteilung (1981).

Anhang:

Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

Ap	: Ampicillin
Cm	: Chloramphenicol
cpm	: "counts per minute" (radioaktive Zerfälle/min)
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
fix-Gene	: Gene für effektive N_2-Fixierung
his	: Gen für Histidin-Biosynthese
kb	: Kilobasenpaar(e) bei DNA
Km	: Kanamycin
MD	: Mega-Daltons = 1×10^6 Daltons
NC(-Filter)	: Nitrocellulose(-Filter)
nif (-DNA, -Gene)	: (DNA oder Gene für) Stickstoff-Fixierung (nitrogen fixation)
nif-Region	: DNA-Region mit der genetischen Information für N_2-Fixierung
"nif-core"	: nif-DNA-Kernbereich bei Rhizobium meliloti, der mit den nif-Genen von Klebsiella pneumoniae hybridisiert
R.meliloti-"nif-Region"	: DNA-Region von Rhizobium meliloti, die das "nif-core" enthält
nod-Gene	: Gene für Nodulation von Leguminosen
RNA	: Ribonukleinsäure
mRNA	: "messenger"-RNA
shiA	: Gen für Shikimisäure A-Transferase
Tn5	: Transposon Nr.5

Weitere Abkürzungen für Nährmedien, Enzyme und Chemikalien s. D.2.

Lebenslauf

Name: B i r g i t J ä c k e l

Geburtstag: 16.6.1953

Geburtsort: Weiden/Opf.

Eltern: Ludwig Jäckel, Dipl.-Ingenieur, und
Michaela Jäckel, geb. Braun

Schulen: 1959-1963 Volksschule in Nürnberg, Dunantstraße
1963-1972 Neues Gymnasium in Nürnberg
(humanistisch-neusprachliches Gymnasium)
23.6.1972 Reifezeugnis des Neuen Gymnasiums in
Nürnberg

Studium: Nov.1972 - Mai 1978 Studium der Biologie an der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
4.10.1974 Diplom-Biologen-Vorprüfung
23.5.1978 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der
Universität Erlangen:
"Untersuchungen zur Herkunft des RP41-Plasmids mittels
der Southern-Technik."

Promotion: ab Juni 1978 am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tätigkeiten: 1.1.79 - 31.3.80 wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Institut für Mikrobiologie in Erlangen,
1.4.80 - 31.12.80 wissenschaftliche Mitarbeiterin
an der Fakultät für Biologie (Lehrstuhl für Genetik)
der Universität Bielefeld
1.1.81 - 31.8.81 wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Institut für Mikrobiologie in Erlangen.

Herrn Prof. Dr. A.Pühler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.
Herrn Prof. Dr. w.Heumann danke ich herzlich für das rege Interesse an meiner Arbeit und für sein freundliches Entgegenkommen, diese Arbeit an seinem Institut zu Ende führen zu können.
Herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die entscheidend dazu beigetragen haben, daß ich in "meinem" Isotopenlabor nicht ganz versauert bin; besonderer Dank gilt Herrn Dr. A.Rösch, der mir vor allem bei der Einrichtung dieses Labors sehr behilflich war.
Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Freunden bedanken, deren wertvolle Anregungen und vor allem psychische und moralische Unterstützung mich in dieser oft sehr frustrierenden Zeit zum Durchhalten ermuntert haben.